



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie.....: قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Etude comparative de la réponse antioxydante d'*Aspergillus tubingensis* et *Serratia marcescens* au stress oxydatif généré par l'antimoine

Préparé par : BOUKARBOUA Roumeïssa

Le : 12/09/2021

MISSI Belkis Aya Ellah

TOUBANE Meriem El Batoul

Jury d'évaluation :

Président du jury : BOULAHROUF Khaled (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : MEGHNOUS Ouissem (MAB- UFM Constantine).

Examinatrice : KASSA-LAOUAR Mounia (MCB- UFM Constantine).

*Année universitaire
2020- 2021*

Remerciements

On remercie en premier lieu notre Dieu qui nous a donné la force, la santé et la patience pour terminer ce travail.

On adresse notre reconnaissance à Mme Ouissem Meghnous Maître Assistante classe B. Université des Frères Mentouri. Constantine, qui a dirigé ce travail, qui nous a si bien encadré, orienté et fait bénéficier de ses précieux conseils, sa riche expérience et de ses compétences. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous Docteure.

On tient à remercier aussi tous les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

A :

Mr le président Boulahrouf Khaled Maître de Conférences classe B. Université des Frères Mentouri. Constantine.

Mme l'examinatrice Kassa-Laouar Mounia Maître de conférence classe B. Université des Frères Mentouri. Constantine.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps enseignants, depuis l'école primaire aux études supérieures pour toutes les connaissances qu'ils nous ont transmises.

Il vous revient le mérite de nous avoir prodigué un enseignement profitable et une formation complète. Veuillez accepter nos remerciements les plus sincères.

On ne saura oublier tous nos proches qui nous ont soutenus durant ces années.

Un très grand merci à nos parents, à nos amis Merci pour tout, pour le soutien infailible dans les moments les plus compliqués, pour les encouragements depuis toujours, par ce travail, on tient à vous rendre hommage, car vous le méritez. Vos persévérances et vos sacrifices sont pour nous des exemples.

Dédicaces

*Afin d'être reconnaissantes_ envers ceux qui nous ont
appuyé et encouragé
À effectuer ce travail de recherche,
Non dédions ce mémoire :*

Dédicace

A MES TRÈS CHERS PARENTS

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que je me suis réalisée.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A MA TRÈS CHER SŒUR Meriem ET SON MARI BILLEL ET MES FRÈRES Houssam ET Zakaria ET SA FEMME OUARDA:

Pour tous les bons moments passés ensemble.

Pour avoir été toujours présentes à mes côtés quand j'en avais besoin. Qu'ils trouvent dans ce modeste travail la preuve de mon amour et ma gratitude éternelle.

A MES AMIES ET A TOUS CEUX QUE J'AIME ET QUI M'AIMENT

Boukarboua Roumeïssa

Dédicace

A MES TRÈS CHERS PARENTS

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que je me suis réalisée.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

A MA TRÈS CHER SŒUR AMINA ET MES FRÈRES CHIHAB EDDINE ET ISSLEM ET SA FEMME AYA :

Pour tous les bons moments passés ensemble.

Pour avoir été toujours présentes à mes côtés quand j'en avais besoin. Qu'ils trouvent dans ce modeste travail la preuve de mon amour et ma gratitude éternelle.

A MES AMIES KENZA, SOUMYA ET MERIEM ET A TOUS CEUX QUE J'AIME ET QUI M'AIMENT ET MA GRAND-MÈRE MATERNELS

Missi Belkis Aya Ellah

Dédicace

A MES TRÈS CHERS PARENTS

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. C'est à travers vos encouragements que je me suis réalisée.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

*Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur
Et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le
chemin de vos enfants. Mama papa je vous aime.*

A MA TRÈS CHERS SŒURS ANFEL ET RAOUNAK ET MON FRÈRE MOUATEZ.

*A Ma Moitié Karima, Mes cousine Kaouthar, Bouchra, Ibtihal, Minna, Aya,
Mayar Et Maram.*

*A mes cousins que j'aime mon frère Raouf sa femme Meriem et sa
petite fille Maria, Fouad, Zakaria, Mehdi, Yasser, Wail, Khalil et
Mouatez.*

*A mes grands-pères Maternels, Ma grand-mère paternelle, Mes oncles
et mes tantes.*

*A mes meilleurs amis Ines, Ines et Zeyneb.
Sans oublier tous ceux qui nous ont quittés dans cette vie.*

Et à tous ceux j'aime et qui m'aiment.

Toubane Meriem El Batoul

Tables des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Table des matières

Introduction1

Synthèse bibliographique

1	Pollution de l'environnement.....	3
1.1	Types de pollution	4
1.2	Pollution de l'environnement par les métaux lourds	5
1.2.1	Métaux lourds.....	5
1.2.2	Origine des métaux lourds.....	6
1.2.3	Mobilité et la biodisponibilité des métaux lourds	7
1.2.4	Les principaux métaux lourds	8
1.2.4.1	Antimoine	8
1.2.5	La toxicité des métaux lourds.....	9
2	Remédiation	11
2.1	Phytoremédiation.....	12
2.2	Bioremédiation	13
3	Mécanismes de tolérance et de résistance aux métaux lourds	15
3.1	Résistance des champignons aux métaux lourds	16
3.2	Résistance des bactéries aux métaux lourds	17
3.2.1	L'exclusion du métal toxique par la perméabilité	18
3.2.2	La séquestration.....	18
3.2.3	Pompage par efflux actif	18
3.2.4	Détoxification enzymatique (oxydoréduction).....	18
3.2.5	production de sidérophores.....	18
4	Stress oxydatif.....	19
4.1	Radicaux libres	19

4.2	Origine des radicaux libres	20
4.3	Cibles biologiques du stress oxydant.....	21
4.3.1	Oxydation de l'ADN	21
4.3.2	Peroxydation des protéines.....	21
4.3.3	Peroxydation des lipides.....	21
5	Métaux lourds et stress oxydatif	22
5.1	Mécanismes d'induction du stress oxydatif par les métaux lourds	22
6	Antioxydants	23
6.1	Antioxydants enzymatiques.....	23
6.1.1	Superoxyde dismutase "SOD" (EC 1.15.1.1).....	24
6.1.2	Catalase"CAT"(EC 1.11.1.6)	24
6.1.3	Peroxydase "POD"(EC 1.11.1.7)	25
6.2	Antioxydants non enzymatiques.....	25
6.2.1	Glutathion (GSH)	25
6.2.2	Vitamines	25
6.2.3	Oligoéléments.....	26
6.2.4	Proline	26
7	Endophytes.....	26
7.1	Champignons endophytes.....	27
7.2	Bactéries endophytes	29

Matériel et méthode

1	Objectif.....	33
2	Description du matériel biologique	33
3	Préparation des biomasses microbiennes pour les analyses des biomarqueurs de toxicité	33
4	Mesure des biomarqueurs de toxicité.....	34
4.1	Préparation de l'extrait enzymatique.....	34
4.2	Teneur intracellulaire en H ₂ O ₂	34
4.3	Mesure du malondialdéhyde (MDA).....	34
5	Dosage des activités enzymatiques antioxydantes	35
5.1	Activité de Catalase (CAT)	35
5.2	Activité de Superoxyde Dismutase (SOD).....	35
	Discussion	36

Conclusion44

Références bibliographie..... 45

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

- **ADH** : Arginine Dihydrolase
- **AGPI** : Acide Gras Polyinsaturé
- **APX** : Ascorbate Peroxydase
- **As** : Arsenic
- **BPC** : Biphényles polychlores
- **CAT** : Catalase
- **CEC** : capacité d'échange de cation
- **CO** : monoxydes de carbone
- **COV** : composés organiques volatils
- **CYA** : Czapek + Extrait de Levures
- **CYB** : Czapek Dox Broth
- **DHAR** : Dehydroascorbate Réductase
- **Eh** : potentiel redox
- **GPX** : Guaicol Peroxydase
- **GR** : Glutathion Réductase
- **GSH**: Glutathion
- **GST**: Glutathion S-transferase
- **HA**: Habitat-adapted
- **HAM** : hydrocarbures aromatiques monocyclique
- **HAP** : hydrocarbures aromatique polycyclique
- **H₂O₂** : Peroxyde d'Hydrogène

- **H₂S** : Hydrogène sulfuré
- **ICP-MS** : spectromètre de masse au plasma à source ionisante d'argon
- **INOS** : Enzyme Inductible Oxyde Nitrique Synthase
- **LDH** : Lysine Décarboxylase
- **MEA**: Gélose à l'Extrait de Malt
- **MDA** : Malondialdéhyde
- **MDHAR** : Monodehydroascorbate Réductase
- **NHA** : Non Habitat-adapted
- **NO** : oxydes d'azote
- **ODC** : Ornithine Décarboxylase
- **OH°**: Radical Hydroxyle
- **ONPG**: Orthonitrophényl-β-galactoside
- **PCS**: Phytochélatine Synthase
- **R°** : Radical Lipidique
- **ROO°** : Radical Peroxyde
- **ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- **Sb** : Antimoine
- **SOD** : Superoxyde Dismutase
- **SO₂** : oxydes de soufre
- **TDA** : Tryptophane Deaminase
- **VP** : Voges-Proskauer

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Chapitre I : Revue de littérature		
Figure 1	Pourcentage des principaux contaminants de la terre	3
Figure 2	Classification périodique des éléments	6
Figure 3	Origine des métaux lourds dans le sol	7
Figure 4	Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds	8
Figure 5	Schéma représente la stratégie de remédiation de l'environnement	11
Figure 6	Représentation schématique de diverses stratégies de phytoremédiation	12
Figure 7	Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds	17
Figure 8	Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant	19
Figure 9	Sources des radicaux libres	20
Figure 10	Les différentes cibles de l'espèce réactive de l'oxygène	22
Figure 11	Les colonies d' <i>A. tubingensis</i> dans le CYA et le MEA à 25°C après 7 jours d'incubation	28
Figure 12	Classification d' <i>Aspergillus tubingensis</i>	29
Figure 13	Identification macroscopique de <i>Serratia marcescens</i>	30
Figure 14	Classification de <i>Serratia marcescens</i>	32
Figure 15	Taux de croissance d' <i>A.tubingensis</i> (a)et de <i>S. marcescens</i> (b) en fonction des concentrations de Sb	37
Figure 16	Teneurs intracellulaires en H ₂ O ₂ chez <i>A.tubingensis</i> (a)et <i>S. marcescens</i> (b) en fonction des concentrations de Sb	37
Figure 17	Contenu en MDA chez <i>A.tubingensis</i> (a)et <i>S. marcescence</i> (b) en fonction des concentrations de Sb	38
Figure 18	Activités de la CAT d' <i>A.tubingensis</i> (a) et <i>S.marcescens</i> (b) en fonctions des concentrations de Sb	39
Figure 19	Activités de la SOD d' <i>A. tubingensis</i> (s) et <i>S.marcescens</i> en fonction des concentrations de Sb	40

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Revue de littérature		
Tableau 1	Toxicité des métaux lourds aux microorganismes	10
Tableau 2	Les principaux facteurs influençant la bioremédiation	14
Tableau 3	Les principaux radicaux libres	20
Tableau 4	Les majeurs antioxydants enzymatiques	24
Tableau 5	La classification des endophytes fongiques	27
Tableau 6	Caractères d'indentification culturaux et biochimiques de <i>S.</i> <i>marcescens</i>	31

Introduction

L'environnement est drastiquement pollué par plusieurs xénobiotiques, notamment les métaux lourds qui sont classés dans la catégorie des polluants de l'environnement les plus dangereux en raison de leur stabilité, leur nature hautement persistante et leurs effets toxiques sur les sols, les microorganismes, les plantes, et l'homme.

Les métaux et les métalloïdes sont des composés stables qui peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs par des réactions trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques et de santé publique (Habi, 2010). En 2007, en Chine, la production mondiale de l'antimoine atteint 135 000 tonnes, ce nombre est important et constitue une menace réelle pour les organismes vivants, pour cela l'Union Européenne et l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement le considère comme étant le polluant le plus dangereux par sa forte toxicité en comparaison avec d'autres métaux (Hg>Cr>As>Cd>Sb) (Tella, 2009).

Avec la toxicité potentielle des métaux dans l'environnement en particulier le sol, il est devenu nécessaire de trouver des solutions efficaces abordables et durables. Certains nombres de techniques ont été développées pour éliminer les métaux toxiques des sols contaminés, en l'occurrence les méthodes physico-chimiques mais elles sont coûteuses et inefficaces, en plus elles détruisent la structure des sols. Il faut donc recourir à de nouveaux processus de restauration des sites pollués par les métaux lourds économiques, efficaces et biologiques ; dont la phytoremédiation à base des plantes et la bioremédiation à base des microorganismes rhizosphériques ou endophytique tolérants aux métaux lourds (Do Nascimento et Xing, 2006).

Depuis quelques années, un nouveau terme envahit le monde des sciences biologiques et médicales c'est le stress oxydant, il se définit comme une situation où la cellule ne contrôle plus la présence élevée de radicaux oxygénés toxiques issus des conditions stressantes comme la salinité, la sécheresse, la lumière élevée, et notamment la contamination par les métaux lourds. Cependant certains microorganismes endophytique résistants peuvent survivre à la toxicité de ces ions métalliques alors que d'autres plus sensibles disparaissent en présence de ces polluants (Favier, 2003 ; Benabdallah *et al.*, 2014) .

Généralement la surproduction d'espèces réactives oxygénées (ROS) est considérée comme le principal mécanisme à l'origine de la cytotoxicité des métaux lourds chez les microorganismes. Cela induit la synthèse des enzymes antioxydantes telles que la catalase (CAT) et le superoxyde dismutase (SOD) ainsi que des composés non enzymatiques; par conséquent les microorganismes sont adaptés aux stress environnementaux extrêmes

(Soufane et *al.*, 2018).

De nombreux travaux ont étudié les effets d'un ou plusieurs composés métalliques sur la croissance des champignons et des bactéries. Dans ce contexte l'impact de l'antimoine sur la croissance d'*Aspergillus tubingensis* et *Serratia marcescens*, isolées à partir des racines d'*Hedysarum pallidum* Desf.

Le présent travail a été mené pour comparer deux travaux de recherches de Meghnous et *al.* (2019) et Kassa-Laouar et *al.* (2020), dont l'objectif est de comparer l'impact de l'antimoine sur *Serratia marcescens* et *Aspergillus tubingensis* aussi l'activité antioxydant des deux endophytes pour la bioremédiation des sols contaminés par l'antimoine.

Ce travail est subdivisé en trois sections ;

La première, est une synthèse bibliographique qui rassemble des données générales sur la pollution de l'environnement, les métaux lourds, leur degré de toxicité, leur impact sur l'environnement et les populations microbiennes, ainsi que le stress oxydatif et sa relation avec les métaux et aussi les mécanismes de résistance des champignons et des bactéries aux métaux lourds, dont la bioremédiation.

La deuxième section, est une description des protocoles expérimentaux utilisés pour l'évaluation du potentiel antioxydant d'*Aspergillus tubingensis* et *Serratia marcescens*. La dernière section est consacrée à la discussion des résultats des deux travaux antérieurs. Nous terminons notre travail par une conclusion générale et des perspectives.

Synthèse bibliographique

1 Pollution de l'environnement

La pollution est une altération de l'environnement sous l'effet de la diffusion des produits toxiques ou des éléments biodégradables et non biodégradables (**figure 1**). Cette détérioration se fait par l'intervention de l'homme ou bien naturellement (par exemple l'éruption volcanique) (Stern, 2008).

La plupart des pollutions sont à l'origine des activités humaines entraînant une dégradation de la qualité de l'environnement.

Ce problème de pollution est présent depuis longtemps, provoquant des risques de la morbidité et de la mortalité des êtres vivants (Chowdhary et al., 2020).

Selon Landrigan et al. (2017) " En 2015, on prévoyait que les problèmes de santé causés par la pollution étaient responsables de 9 millions de décès prématurés, soit plus de 3 fois le nombre de décès dus au paludisme, au sida et à la tuberculose réunis". Aussi la pauvreté, la législation insuffisante et l'ignorance des formes de pollution sont les principales raisons de la propagation de la pollution dans les pays pauvres par rapport aux pays développés (Muralikrishna et Manickam, 2017).

De plus, les déforestations, le brûlage de buisson, le déversement des déchets agricoles et ménagers dans la masse d'eau contribuent à la pollution de l'eau, des sols et de l'air (Chowdhary et al., 2020).

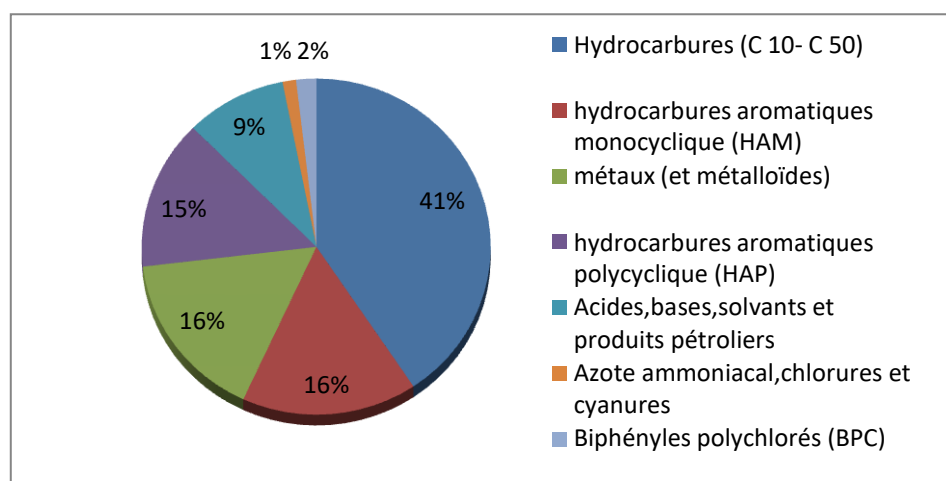


Figure 1 : Pourcentage des principaux contaminants de la terre (Bilan des terrains contaminés, 31 décembre 2010).

1.1 Types de pollution

Au cours des deux dernières décennies, divers types de pollution ont été discutés, modifiant ainsi la composition de l'eau, du sol et de l'air. Cette pollution agit l'une sur l'autre, la pollution de l'air retombe sur le sol, la pollution du sol pénètre jusqu'aux nappes d'eau souterraine, à cause des polluants chimiques (métaux toxiques, gaz) géochimiques (poussière des sédiments), biologiques (les organismes pathogènes) et physiques (chaleur, rayonnements) (Stern, 2008 ; Chowdhary et *al.*, 2020).

a. pollution de l'air

La pollution de l'air c'est l'introduction des éléments chimiques toxiques dans l'atmosphère qui peuvent être dangereux pour les êtres vivants, entraînant une diminution de la qualité de l'air et la qualité de vie sur la terre à cause du réchauffement de la planète et d'affaiblissement de la couche d'ozone (Chowdhary et *al.*, 2020).

La source, la forme, les conditions de production et les différentes caractéristiques des polluants contrôlent leur distribution et leurs effets. Les polluants gazeux les plus courants sont : les oxydes de soufre (en particulier le SO₂), les oxydes d'azote (y compris le NO et le NO₂), les gaz à effet de serre, les composés organiques volatils (COV) et les monoxydes de carbone (CO), ces polluants gazeux sont regroupés en polluant primaire et secondaire, pour cela la pollution atmosphérique est considérée étant la plus dangereuse des pollutions (Chowdhary et *al.*, 2020).

b. pollution de l'eau

La pollution de l'eau est due soit aux activités naturelles ou anthropiques. Généralement, les activités naturelles proviennent des minerais naturels riches en métaux toxiques qui pénètrent dans les masses d'eau souterraines causant leur pollution (Ewuzie et *al.*, 2019).

La pollution aquatique anthropique est causée par les déchets domestiques, chimiques, médicaux, les déchets de transformation des aliments, les polluants provenant des activités d'élevage et les métaux lourds provenant des déchets électroniques (Chowdhary et *al.*, 2020).

Ces polluants peuvent provoquer des effets néfastes sur la santé humaine tels que : les maux d'estomac, les vomissements, les diarrhées, la typhoïde, le cancer, les déséquilibres hormonaux, les troubles de la reproduction et de graves lésions hépatiques et rénales allant jusqu'à la mort (Chowdhary et *al.*, 2020).

c. pollution du sol

Hormis les catastrophes naturelles, l'homme joue un rôle principal dans la destruction du sol par les activités produites des déchets industriels et domestiques, tels que, les métaux lourds, les hydrocarbures, les solvants organiques et inorganiques, les combustibles fossiles provenant des usines pétrochimiques et des raffineries de pétrole. Ces derniers sont les principaux polluants du sol (Chowdhary et *al.*, 2020).

La présence des déchets plastiques dans les sols attire l'attention mondiale, en raison de la nature toxique des additifs utilisés dans leur fabrication et des effets indirects des plastiques sur les plantes et les animaux (Chowdhary et *al.*, 2020).

1.2 Pollution de l'environnement par les métaux lourds

Selon Declaration on Risk Reduction for Lead (1996) « les métaux lourds sont étroitement liés à l'altération de l'environnement et de la qualité de la vie humaine, de plus en plus, des pays ont signé de traiter ce problème par la surveillance et la réduction des métaux lourds à cause de leur forte toxicité. Tandis que certains métaux présentent un rôle essentiel à la vie des plantes et des animaux, leur effet bénéfique peut être transformé en effet toxique selon leur quantité et forme chimique ».

En raison de l'absence des activités industrielles la balance de métaux lourds dans l'écosystème était en équilibre, cependant avec la révolution industrielle, l'introduction de ces polluants est intensifiée ce qui a provoqué un déséquilibre de la balance du cycle naturel en s'accumulant dans les cellules des êtres vivants, provoquant des effets néfastes (Malayeri, 1995).

1.2.1 Métaux lourds

Les métaux lourds sont un groupe d'éléments inorganiques de masse volumique 5 Kg/dm³. Ils sont présents dans la nature : eau, sol et air sous différentes formes chimiques. Les scientifiques les appellent « élément traces métallique ETM » parce que on les trouve en quantité très faible (Benhamdi, 2014).

D'un point de vue chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux, physiquement, les métaux lourds signifient les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes « environ 65 éléments » (**figure 2**) et biologiquement, selon leurs effets physiologiques et toxiques. On distingue deux types des métaux : des métaux essentiels et des métaux non essentiels (Huynh, 2009).

Synthèse bibliographique

Les métaux essentiels sont des éléments vitaux à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires, lorsque la concentration du « Cuivre (Cu), Fer (Fe), Nickel (Ni) et Zinc (Zn) » dépasse un certain seuil peuvent devenir toxiques. Les métaux non essentiels comme le Cadmium (Cd), le Mercure (Hg) et le Plomb (Pb), sont des polluants avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faibles concentrations (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

1a										0																									
1	H		IIa																	IIIa		IVa	Va	VIa	VIIa	2	He								
3	Li	4	Be																	5	B	6	C	7	N	8	O	9	F	10	Ne				
11	Na	12	Mg		IIIb	IVb	Vb	VIb	VIIb	VIII			Ib	IIb	13	Al	14	Si	15	P	16	S	17	Cl	18	Ar									
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
55	56	57 *	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
87	88	89 **	104	105	106	107	108	109	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9																									
* lanthanide series		58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71																				
		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu																				
** actinide series		90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103																				
		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr																				

Figure 2 : Classification périodique des éléments (Kabata-Pendias et Pendias, 2001)

1.2.2 Origine des métaux lourds

Les métaux lourds sont des éléments naturels diffusés dans l'environnement par divers procédés. Généralement ils sont introduits naturellement (fonds géochimiques) et par les activités anthropiques (**figure 3**) (Boufligha et al., 2013).

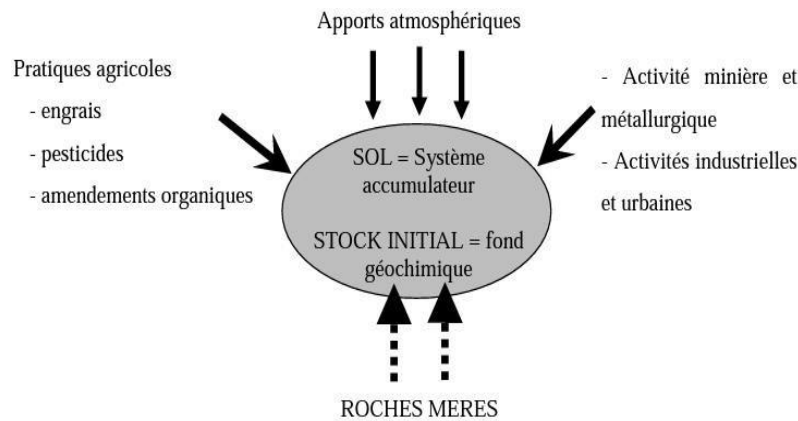


Figure 3 : Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999).

a. Origine naturelle

Les roches sont la source principale des métaux lourds, lors du processus d'altération, elles les libèrent pour créer le fonds géochimique ; selon la nature de la roche, sa localisation, et son âge, la concentration des métaux lourds est variée (Bourrelier et Berthelin, 1998).

b. Origine anthropique

La source majeure de la contamination par les métaux lourds est d'origine anthropique, due à la pollution atmosphérique, liée aux activités agricoles et industrielles qui sont responsables de l'augmentation des flux de métaux. Huynh (2009), « estime l'apport de métaux lourds au sol à 22000 tonnes de cadmium, 939000 t de cuivre, 783000 t de plomb et 1350000 t de Zinc ».

1.2.3 Mobilité et la biodisponibilité des métaux lourds

La spéciation et les facteurs environnementaux jouent un rôle majeur dans la toxicité des métaux lourds (Huynh, 2009). Dans le sol, les métaux se trouvent sous forme d'ions libres « forme intoxicante » donc, ils sont biodisponibles ou sous forme liée à des particules du sol « forme toxique » (**figure 4**) ; les métaux lourds sont des éléments cationiques pouvant réagir dans le sol avec toutes les particules chargées négativement « organiques ou minérales ». Plusieurs facteurs du sol sont responsables de la biodisponibilité des métaux lourds parmi lesquels : la capacité d'échange de cation (CEC), le pH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques (Huynh, 2009).

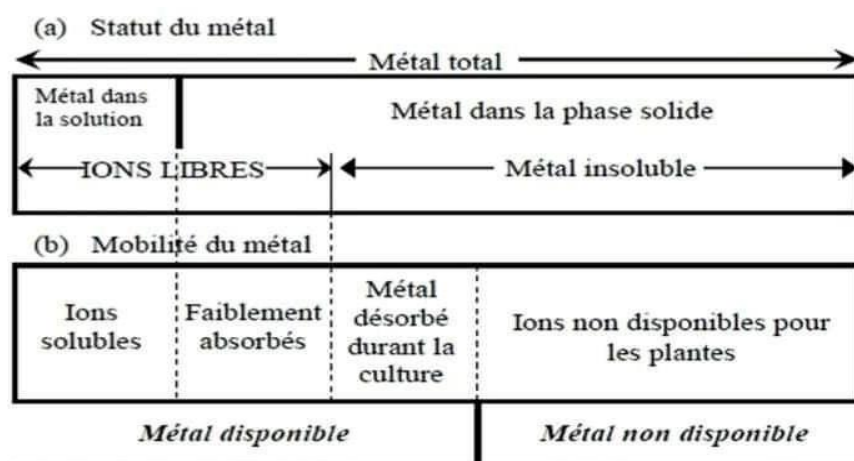


Figure 4 : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (D'après Shallari, 1997).

1.2.4 Les principaux métaux lourds

Dans l'écosystème, il existe de nombreux types de métaux lourds essentiel et non essentiel : l'Antimoine (Sb), l'Arsenic (As), le Cadmium (Cd), le Chrome (Cr), le Cuivre (Cu), le Manganèse (Mn), le Mercure (Hg), le Nickel (Ni), le Plomb (Pb) et le Zinc (Zn).

1.2.4.1 Antimoine

L'antimoine est un élément inorganique de masse atomique 121.7 mol/g, d'une densité de 6.70, de symbole chimique Sb, occupe la 51^{ème} position dans le tableau périodique et situé dans la quinzième colonne avec l'azote, le phosphore, l'arsenic et le bismuth (groupe des pnictogènes) (Louaar et Maatoug, 2016). L'antimoine ne peut pas classer ni avec les métaux ni les non métaux (Naquet et Hanriot, 1980)

Généralement, l'antimoine est présent sous la forme d'un solide gris argenté brillant à température ambiante. Sous forme métallique, il est cassant, résistant aux attaques acides et il s'oxyde en Sb_2O_3 quand est chauffé sous atmosphère oxydant. Rarement l'antimoine est présent sous sa forme native (Sb), donc c'est un mauvais conducteur de chaleur et d'électricité. La poudre d'antimoine diffuse dans l'air et peut être explosive (Audion, 2012). Il contient deux isotopes stables 121 et 123 et l'abondance moyenne respective est de 57.4% et 42.6% (Beaugelin-Seiller et Garnier-laplace, 2002).

D'après Deneux-Mustin et al. (2003) « Les sources d'antimoine stable sont liées aux activités minières, industrielles et au trafic automobile, avec des rejets mondiaux estimé à environne 38 tonnes par an ».

D'après le centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, la spéciation

chimique d'un élément est l'identification et la quantification des métaux et des métalloïdes qui se trouve sous différentes formes chimiques.

L'antimoine est un analogue chimique de l'arsenic avec une toxicité similaire. Dans la nature il existe quatre degrés d'oxydation d'antimoine ; Sb^{-3} (e.g. trihydrure d'antimoine, SbH_3), Sb^0 (forme métallique), Sb^{+3} et Sb^{+5} (e.g. Sb_2O_3 , Sb_2S_3 , Sb_2O_5 et antimonites et antimonates de métaux). Ces dernières sont les plus fréquentes, dont les composés trivalents appliquent une toxicité aiguë 10 fois plus élevée que les formes pentavalentes (Deneux-Mustin, 2003 ; Tella, 2009).

D'après le centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, beaucoup de recherches sont orientées vers la détermination des méthodes analytiques pour sa spéciation dans l'environnement, parmi ces méthodes : le couplage entre une chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et un spectromètre de masse au plasma à source ionisante d'argon (ICP-MS) dans les échantillons aqueux.

1.2.5 La toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds toxiques ont des effets néfastes sur les microorganismes, ils provoquent des réactions spécifiques ou des stress compromettants comme indiqué dans le **tableau 1** (Habi, 2009). Parmi les effets toxiques ; l'inhibition de l'activité enzymatique par la fixation des métaux sur les atomes d'oxygène, d'azote, de soufre et surtout sur les résidus de cystéine, inhibant ainsi l'activité de nombreuses enzymes par le blocage des groupes fonctionnels des molécules biologiques importantes, aussi le déplacement et /ou le remplacement d'ions essentiels dans les biomolécules ainsi que le changement de conformation et la dénaturation ou l'inactivation des enzymes et aussi la rupture de tout type de membrane cellulaire (Bellion, 2006).

Selon Berthelot (2017) « les microorganismes sont les premiers organismes en contact direct avec la pollution. Les effets des ETM sur les microorganismes se résument ont une diminution de la biomasse microbienne, sa diversité et son activité. De plus, les ETM engendrent également une diminution de la décomposition de la matière organique et de la respiration. L'effet des ETM sur les communautés microbiennes varie en fonction du groupe d'organismes considéré, de l'élément étudié et de l'environnement. Il a été rapporté à plusieurs reprises que les communautés bactériennes sont plus sensibles aux l'ETM que les communautés fongiques ».

Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Toxicité des métaux lourds aux microorganismes

Métaux lourds	Effets sur les microbes
Arsenic	Désactiver des enzymes
Cadmium	Dénaturer les protéines, détruire les acides nucléiques, entraver la division cellulaire et la transcription
Chrome	Inhiber la croissance et l'absorption d'oxygène et allonger la phase de latence
Cuivre	Perturber la fonction cellulaire, inhiber les activités enzymatiques
Plomb	Détruire les acides nucléiques et les protéines, inhibe les actions enzymatiques et la transcription
Mercurure	Dénaturer les protéines, inhibe la fonction des enzymes et perturber les membranes cellulaires
Nikel	Contrarie les membranes cellulaires, entraver les activités enzymatiques et le stress oxydatif
Zinc	La mort, déminer la biomasse et inhibe la croissance

La mobilité du métal, identifie sa concentration endogène et par conséquent sa toxicité (Michel, 2009). Tous les éléments sont toxiques quand ils sont absorbés en excès par rapport à la capacité d'assimilation de l'organisme (Benabdallah et Kouadra, 2014).

L'introduction des métaux lourds dans la rhizosphère s'exprime par une interaction avec les autres composants ioniques du sol. Les métaux peuvent alors précipiter avec des ligands anioniques ou entrer en compétition avec d'autres cations pour des sites de liaisons de la paroi pecto-cellulosique des cellules racinaires (Michel., 2009). Dû au fait que la paroi présente une capacité importante d'échange de cations, les changements significatifs du métabolisme sont provoqués par l'inhibition ou la stimulation de l'absorption des cations, ces dernières sont considérées comme le premier effet toxique des métaux lourds (Michel, 2009).

Les métaux lourds affectent les différentes parties de la plante en particulier les feuilles, ils provoquent une perte de la chlorophylle, ce qui induit une augmentation des teneurs en caroténoïdes et une carence en fer (Prasad et Strzałka, 2002). Ces effets sont responsables de l'altération des processus vitaux tels que le transport et le métabolisme. Aussi, une diminution de la conductivité hydraulique racinaire associée à la fermeture des stomates entraînant une réduction de la transpiration (Michel, 2009).

La diminution de la photosynthèse par les métaux lourds influence le transport des électrons et les enzymes du cycle de Calvin « effet direct », et l'abaissement de la teneur en chlorophylle « effet indirect » (Michel, 2009).

En général, les éléments traces métalliques affectent l'être humain par voie respiratoire ou par voie cutanée ou bien par l'ingestion (Martine et Griswold, 2009). Des petites doses de métaux chez l'homme se manifestent par un effet cancérigène, un effet sur la fonction immunitaire et un effet sur le système nerveux (Louaar et Maagtoug, 2016).

2 Remédiation

Depuis la fin du 20^{ème} siècle, la terre devient de plus en plus contaminée par des polluants toxiques parmi ces polluants les métaux lourds. Ils sont difficiles à éliminer à cause de leur non-biodégradabilité et de leur nature persistante (Hasanuzzaman, 2021).

Pour pallier aux problèmes de contamination, des techniques de dépollution physico-chimiques ont été utilisées, qui sont efficaces pour éliminer ces polluants, mais présentant des inconvénients, elles sont coûteuses, difficiles à mettre en œuvre, endommagent et altèrent gravement les propriétés du sol (Huynh, 2009). Pour cela, de nouvelles techniques biologiques prometteuses ont été utilisées afin de préserver l'environnement notamment les propriétés du sol (**Figure 5**). Les approches biologiques sont généralement les méthodes de bioremédiation et de phytoremédiation.



Figure 5: Schéma représente la stratégie de remédiation de l'environnement (Karigar et Rao, 2011).

2.1 Phytoremédiation

Le terme phytoremédiation dérive du mot grec "*phyto* = plante" et du mot latin "*remedium* = restaurer". C'est une méthode qui repose sur l'utilisation des plantes pour éliminer stabiliser, transformer, immobiliser, détoxifier et stocker les contaminants organiques et inorganiques particulièrement les métaux lourds (Batty et Dolan, 2013).

La phytoremédiation peut être utilisée dans les opérations de dépollution des sites contaminés à grande échelle, ainsi elle minimise la perturbation de l'environnement. Dans ce processus les plantes sont facilement cultivables favorisant la croissance des bactéries dans la partie racinaire (Chandra et al., 2020).

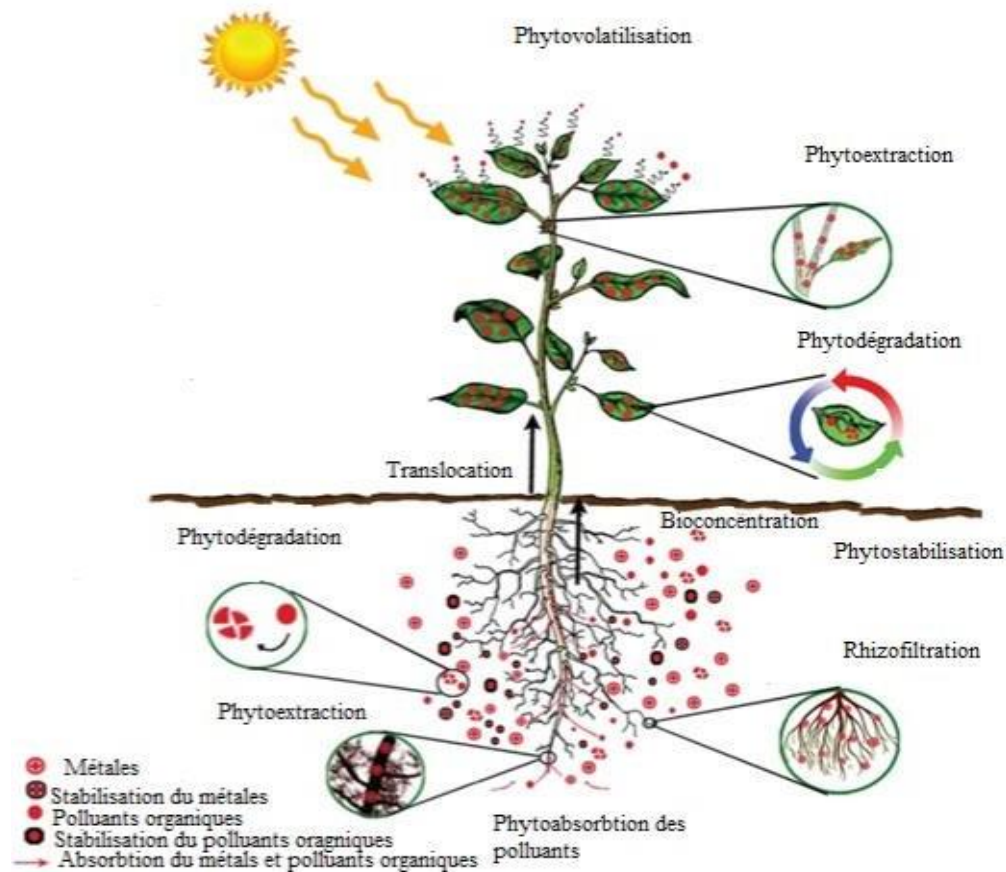


Figure 6 : Représentation schématique de diverses stratégies de phytoremédiation (Chandra et al., 2020).

Comme expliqué dans la (figure 6) ; Selon le type du contaminant, sa biodisponibilité et les propriétés du sol, divers mécanismes de phytoremédiation ont été discutés :

- a. **Phytoextraction** : est l'utilisation des plantes pour absorber les contaminants par les racines en les accumulant dans la partie aérienne (Do Nascimento et Xing, 2006).
- b. **Phytostabilisation (inactivation sur place)** : est l'utilisation des plantes pour réduire la disponibilité, la mobilité et empêcher la migration des contaminants par adsorption sur les racines (Pulford et Watson, 2003).
- c. **Phytofiltration** : est une combinaison de la phytoextraction et la phytostabilisation dans laquelle on utilise les plantes aquatiques pour purifier les eaux par absorption et adsorption des métaux toxiques (Deshmukh et *al.*, 2020).
- d. **Phytodégradation (Phytoremédiation)** : est l'utilisation de l'association plantes / microorganismes pour dégrader les polluants organiques complexes en composés plus simples qui seront intégrés dans les tissus de la plantes (Abdelly, 2006).
- e. **Phytovolatilisation** : est la transformation des polluants du sol en forme volatile et non toxique dans l'atmosphère à partir des feuilles (Limmer et Burken, 2016).

Parmi les différentes méthodes de phytoremédiation, la plus utilisée est la phytoextraction dans laquelle des espèces hyper accumulatrices sont utilisées pour absorber une grande quantité de métaux (Abdelly, 2006).

2.2 Bioremédiation

La bioremédiation est un processus biologique naturel qui consiste à utiliser des microorganismes particulièrement, les champignons et les bactéries, qui ont la capacité de dégrader ou détoxifier les substances dangereuses (xénobiotiques) par des réactions métaboliques (Vidali, 2001), pour obtenir de l'énergie et des éléments constitutifs (Alvarez et Illman, 2008).

Tableau 2 : Les principaux facteurs qui influencent la bioremédiation (Das, 2014).

Facteurs	Conditions requises
Microorganismes	Aérobie ou anaérobie
Processus naturels des microorganismes	Catabolisme et anabolisme
Facteurs environnementaux	T°C, pH, teneur en oxygène, accepteur/ donneur d'électron
Nutriments	Carbone, azote, oxygène
Humidité du sol	25-28% de la capacité de rétention d'eau
Type de sol	Faible teneur en argile ou en limon

La disponibilité d'une population microbienne capable de dégrader les polluants, la présence des contaminants et les facteurs environnementaux (le type de sol, la température, le pH, la présence d'oxygène ou d'autres accepteurs d'électron et de nutriments) ; sont les principaux facteurs (voir tableau 2) qui optimisent et contrôlent le processus de bioremédiation (Das, 2014).

Plusieurs mécanismes microbiens interviennent dans la bioremédiation des métaux ;

a. La biosorption : c'est la capacité des microorganismes de fixer des ions métalliques cationiques dans les membranes cellulaires chargées négativement par la sécrétion de polysaccharides (Singh et Tripathi, 2007). Lorsque ce phénomène est sous l'intervention des bactéries biosorbants est appelé « la biosorption », tandis que l'utilisation des champignons est appelées « la mycosorption» (Singh, 2006).

b. La bioaccumulation : les microorganismes ont le pouvoir d'accumuler les métaux lourds de l'extérieur à l'intérieur de la cellule à travers la membrane cellulaire puis dans le cytoplasme dans lequel ils deviennent immobiles (Singh et Tripathi, 2007).

c. La biolixiviation : est une méthode utilisant des bactéries acidophiles pour la solubilisation des métaux lourds en présence et en absence d'oxygène avec une température entre 25 et 35°C et une taille de particules plus proches des bactéries (Abdelly, 2006).

d. La bioimmobilisation : est l'utilisation des microorganismes qui ont la capacité d'immobiliser les polluants présentement à l'état soluble (Barkay et Schaefer, 2001).

e. La biodégradation : est la transformation des composants toxiques par des microorganismes en substrat moins toxique afin de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie (Nouri et Haddioui, 2016).

En fin, la bioremédiation est une technologie utilisée pour la décontamination in situ d'une grande variété de contaminants toxiques avec un faible coût (Vidali, 2001).

Plusieurs populations microbiennes telles que les champignons et les bactéries vivent dans des environnements contaminés par les métaux lourds à effets néfastes, pour cela, ces microorganismes ont développé des mécanismes de protection contre ces polluants (Gadd, 2001).

Les bactéries ont un large potentiel de bioremédiation et elles sont bénéfiques sur le plan environnemental et économique en raison de leur capacité de réduction du niveau de danger de divers substances naturelles et synthétiques. Les méthodes de la bioremédiation ont exploité le pouvoir métabolique naturel de ces microorganismes pour dégrader, transformer ou accumuler des composants toxiques (Das, 2014).

Les champignons sont des microorganismes prometteurs pour la bioremédiation. Ils colonisent toutes les surfaces, en produisant des enzymes extracellulaires oxydatives et hydrolytiques, dégradant et détruisant une large gamme de composés toxiques par des processus métaboliques. Ce mécanisme est connu sous le nom de « mycodégradation » et « mycodétérioration » (Singh, 2006 ; Baldrian, 2008).

Les mycorhizes sont des interactions symbiotiques entre les champignons et les racines des plantes, ces interactions sont caractérisées par leur grande résistance aux conditions de sécheresse extrême, à la salinité élevée du sol et à la toxicité des métaux lourds. Elles ont pour rôle le transport des nutriments dans la rhizosphère et la protection de l'écosystème contre les métaux lourds (Gadd, 2001, Singh, 2006).

3 Mécanismes de tolérance et de résistance aux métaux lourds

Des concentrations élevées en métaux essentiels ou non-essentiels, dans l'environnement sont nocives pour les êtres vivants, elles endommagent les membranes cellulaires, empêchent la fonction des cellules et détruisent la structure de l'ADN, en modifiant la spécification des enzymes, aussi elles peuvent conduire à une diminution de la diversité microbienne. Cependant, certains microorganismes ont développé des mécanismes

de tolérances en s'adaptant aux environnements fortement pollués par les métaux lourds (Kumar et Saxena, 2020).

Selon Jacob (2001) « les termes "tolérance" et "résistance" de façon interchangeable et sans claire distinction. On peut distinguer les deux termes, la "résistance" peut être définie comme la capacité d'un organisme à se développer en présence des métaux toxiques par la mise en œuvre de mécanismes de détoxification en réponse directe à l'élément métallique (synthèse de métallothionéine par exemple). Le terme "tolérance" c'est le pouvoir d'un organisme à survivre à la toxicité des métaux par le moyen de propriétés intrinsèques et /ou de la modification de la toxicité par des paramètres environnementaux (possession de parois cellulaires pigmentées imperméables, ...) ».

Les organismes vivants ont développé plusieurs mécanismes de résistance par lesquels ils maintiennent la concentration des métaux essentiels tels que, Cu, Mn et Zn dans les barrières physiologiques et à minimiser les effets néfastes des métaux non essentiels comme Cd, Hg et Pb. Donc ils limitent l'accumulation de ces éléments dans leurs cellules (exclusion), dans les vacuoles (chélation et séquestration) et / ou activent les systèmes antioxydants (Redon, 2009 ; Kassa-Laouar et *al.*, 2020). De nombreuses études ont montré que les différents acteurs du système sol-plante (plante, champignons et bactéries) sont présents dans des sites pollués par des métaux lourds (Deuneux-Mustin et *al.*, 2003).

Généralement un nombre limité de plantes se révèlent capables de croître sur des sols riches en métaux lourds. Des mécanismes de tolérance des plantes à la toxicité de certains métaux sont mal connus, mais ces mécanismes sont largement discutés : l'exclusion qui consiste à éviter l'absorption des métaux présents à des concentrations élevées dans le sol, la détoxification et l'accumulation voire l'hyperaccumulation, qui se traduisent par une absorption des métaux (Deuneux-Mustin et *al.*, 2003 ; Michel, 2009).

3.1 Résistance des champignons aux métaux lourds

Les champignons révèlent une très grande tolérance aux métaux lourds, ils sont les microorganismes dominants dans les environnements pollués (Benabdallah et Kouadra, 2014). La tolérance n'est pas la même chez toutes les espèces fongiques, selon le type d'élément, la nature du milieu et la population fongique la réponse des champignons aux excès de métaux lourds est variée (Malayeri, 1995). Les champignons sont connus pour tolérer et détoxifier les sites contaminés par les métaux lourds en utilisant plusieurs mécanismes comme immobilisation, biotransformation, solubilisation.

3.2 Résistance des bactéries aux métaux lourds

Le rôle biologique du métal dans la cellule contrôle la nature des interactions bactéries-métaux, qui est étudié dans les environnements extrêmes. Chez les bactéries, la présence des espèces métalliques comme cofacteurs enzymatiques est importante pour leurs fonctionnement mais, elles deviennent toxiques à des concentrations élevées tel que Zn^{2+} , Cu^+ et Fe^{2+} (Haouchine et Leham, 2016).

Une cellule bactérienne développe des stratégies de résistance à ces éléments toxiques pour protéger ces constituants cellulaires. Le type et le nombre de mécanismes pour l'absorption des métaux, le rôle de chaque métal dans le métabolisme et la présence dans le plasmide aussi les chromosomes et les transposons sont les principaux paramètres qui contrôlent la résistance (Boufligha *et al.*, 2013).

Le mécanisme de résistance est en général plasmidique mais peut être aussi chromosomique, cette résistance acquise est liée à l'apparition de mutation spontanée et aléatoire. La **figure 7** illustre les différents mécanismes de résistance qui développés par les bactéries pour s'adapter aux concentrations élevées de métaux (Deuneux-Mustin *et al.*, 2003 ; Boufligha *et al.*, 2013).

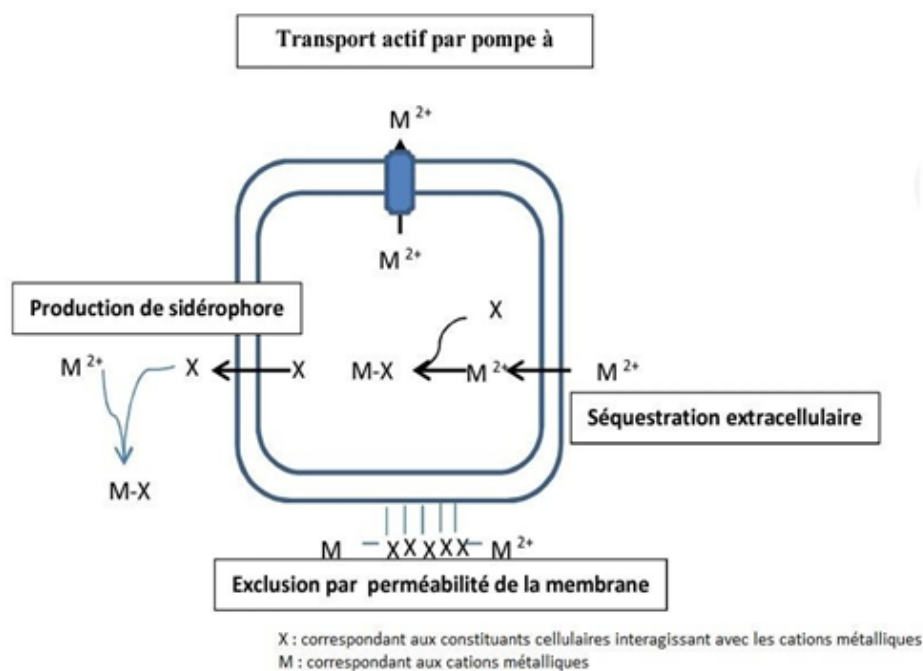


Figure 7 : Mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds (Haferburg et Kothe, 2007).

3.2.1 L'exclusion du métal toxique par la perméabilité

L'exclusion métallique est un système non spécifique, qui empêche l'intégration des ions métalliques avec les composants cellulaires vitaux, soit par une modification du système de transport membranaires soit par un arrêt de la production de la porine responsable de la perméabilité membranaire (Deuneux-Mustin et *al.*, 2003 ; Louaar et Maatoug, 2016).

3.2.2 La séquestration

La séquestration est la première ligne de défense pour immobiliser rapidement les métaux et pallier leurs effets toxiques. Elle peut être intracellulaire ou extracellulaire, les deux sont effectuées par des composants fixateurs des ions métalliques spécifiques (métallothionéines) et/ou ségrégation en composés complexes (Habi, 2009 ; Haouchine et Leham, 2016).

3.2.3 Pompage par efflux actif

C'est le mécanisme le plus utilisé chez les bactéries. Il implique des protéines membranaires très spécifiques exporteuses des métaux toxiques de l'intérieure à l'extérieurs de la cellule (Ferret, 2012).

3.2.4 Détoxification enzymatique (oxydoréduction)

L'oxydoréduction est un processus récurrent dans le mode bactérien, elle convertit un ion plus toxique en un ion moins toxique (Habi, 2009).

3.2.5 Production de sidérophores

La production de sidérophores c'est l'une des stratégies les plus fréquemment développées par les bactéries pour réduit la biodisponibilité des métaux lourds et sa toxicité par la formation des complexes stables avec les métaux, tels que Cd, Cu, Al, Pb et Zn en particulier le fer. La liaison du sidérophore à un métal peut solubiliser, immobiliser le métal et empêcher son entrée dans la cellule (Rajkumar et *al.*, 2010). Si les bactéries utilisent leur propre sidérophore, elles sont dites sidérophore endogènes, si elles utilisent ceux qui sont synthétisés par d'autres organismes, elles sont dites sidérophores exogènes (Kassa-Laouar et *al.*, 2020).

4. Stress oxydatif

Le stress oxydatif (stress oxydant) est un déséquilibre de la balance oxydants / antioxydants (Atamer et *al.*, 2008), dans lequel l'oxygène réactif toxique surmonte les défenses antioxydantes endogènes de l'hôte ; la génération de ce stress est due à la surproduction des radicaux libres qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme. Donc l'origine du stress oxydatif sont les radicaux libres (Soufane et *al.*, 2018).

4.1 Radicaux libres

Selon Carange (2010) « un radical libre est une espèce chimique qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe (**Figure 8**). La présence d'un électron non apparié confère à ces molécules une grande instabilité, c'est-à-dire qu'elles sont extrêmement réactives et leur durée de vie est courte ».

Les radicaux libres jouent un rôle comme accepteur d'électron en arrachant des électrons à d'autres molécules (Gilgun-Sherki et *al.*, 2001). Ces électrons libres sont exprimés par l'ajout du symbole $^{\circ}$ ou \bullet dans la formule chimique des radicaux libres. Par exemple, le radical superoxyde est noté O_2° ou O_2^{\bullet} (Bothorel, 2011).

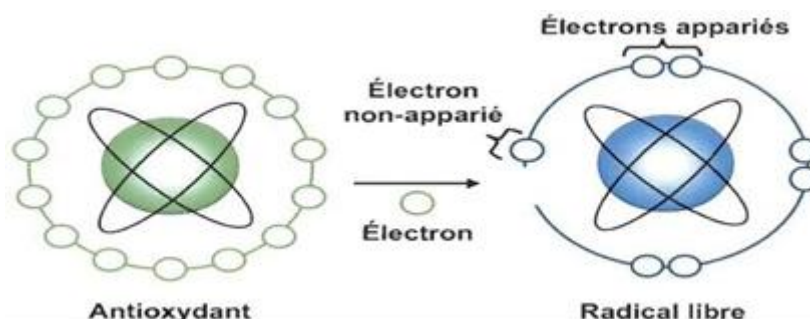


Figure 8 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant
<http://plantes.wellandyou.eu/gammes/explication-anti-oxydant/>

Parmi les différents groupes de radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont les radicaux les plus réponsus (Carange, 2010), qui sont cités dans **le tableau 3** :

Tableau 3 : Les principaux radicaux libres (Haton, 2005).

Oxygène	O_2
Oxygène singlet	1O_2
Anion super oxyde	$O_2^{\circ-}$
Radical hydroxyle	OH
Radical hydroperoxyde	HOO
Radical peroxyde	ROO
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO°
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO°

4.2 Origine des radicaux libres

Les êtres vivants sont continuellement exposés aux radicaux libres. La figure 9 regroupe les sources de ces radicaux en deux groupes ; exogènes et endogènes. La pollution atmosphérique, la cigarette, le rayonnement UV, les radiations ionisantes et les métaux lourds sont considérés comme des sources exogènes (Carange, 2010), tandis que les sources endogènes sont les métabolismes cellulaires ; les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes (Benhamdi, 2014).



Figure 9 : Sources de production des radicaux libres

<http://plantes.wellandyou.eu/gammes/explication-anti-oxydant/>

4.3 Cibles biologiques du stress oxydant

Les ROS sont très réactives possédant une grande toxicité, pouvant endommager les constituants cellulaires tels que ; l'ADN, les protéines et les lipides (**Figure 10**) (Haton, 2005).

4.3.1 Oxydation de l'ADN

Les ROS provoquent des altérations oxydatives au niveau de l'ADN, ces altérations sont regroupées en quatre groupes ; les coupures simple et double brin, la modification de bases, la formation du site abasique et les pontages ADN-protéines (Louaar et Maatoug, 2016).

Le radical hydroxyle (OH°), provoque des mutations ponctuelles ou altère les systèmes de réparation. Ces modifications vont ainsi déstabiliser la transcription et la traduction qui donnent à la fin une protéine non fonctionnelle (Valko et *al.*, 2007).

4.3.2 Peroxydation des protéines

Haton (2005) rapporte que les acides aminés peuvent être oxydés par les ROS, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) étant les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme les réticulations intra ou intermoléculaires. Ces altérations peuvent conduire à des modifications structurales des protéines. Dans le cas d'enzymes, les modifications au niveau du site actif peuvent conduire à leur inactivation.

4.3.3 Peroxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les composants les plus facilement oxydés par les ROS à cause de la présence d'hydrogène bis-allylique. La première réaction consiste à éliminer un atome d'hydrogène par OH° dans lequel un acide gras (RH) devient (R°). Ce radical lipidique (R°) fait un réarrangement moléculaire pour donner un radical plus stable, qui réagit avec une molécule d'oxygène pour donner un radical peroxyde (ROO°), suffisamment réactif pour enlever un H^+ à un AGPI voisin (Louaar et Maatoug, 2016).

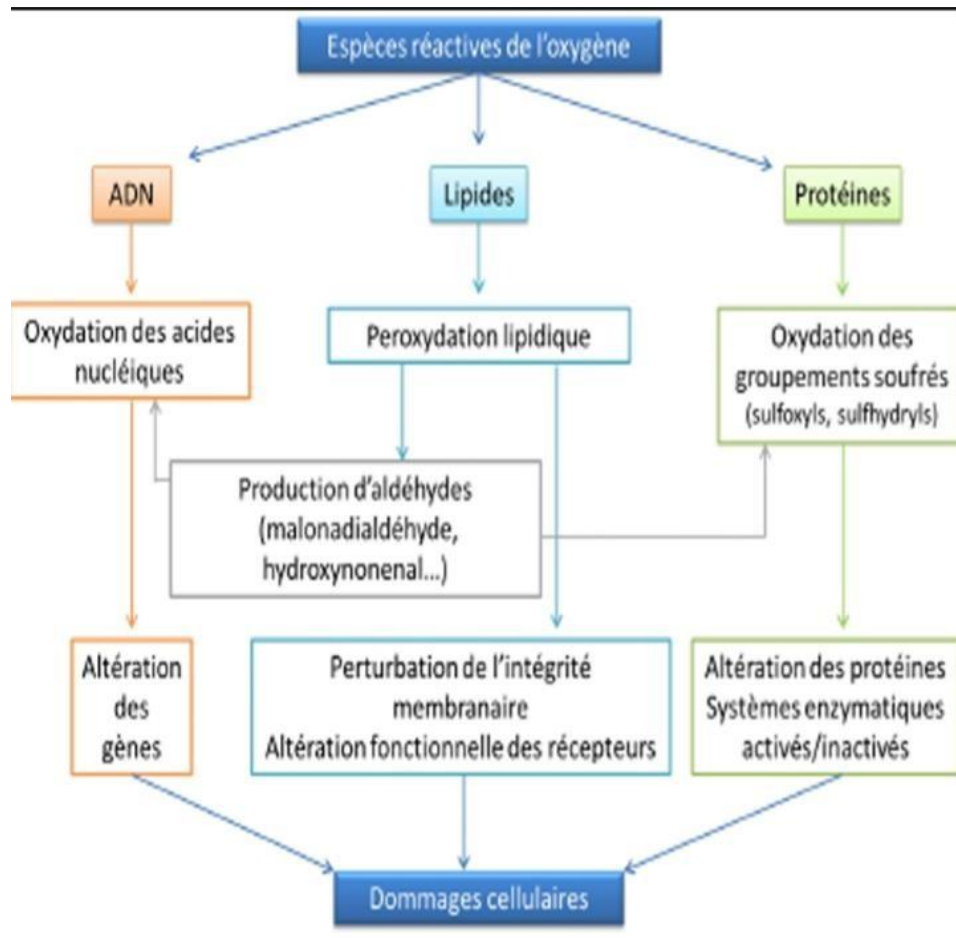


Figure 10 : Les différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (Monteil, 2004).

5 Métaux lourds et stress oxydatif

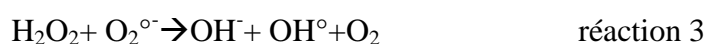
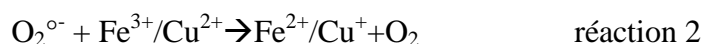
Les éléments traces métalliques sont les principaux inducteurs du stress oxydatif (Melila *et al.*, 2012).

5.1 Mécanismes d'induction du stress oxydatif par les métaux lourds

Dans les conditions extrêmes, tous les types de biomolécules peuvent être attaqués par les ROS tels que : O_2° , H_2O_2 et OH° . L'exposition des microorganismes à certains ions métalliques change l'équilibre du métabolisme des radicaux libres vers une accumulation d' H_2O_2 (Gill et Tuteja, 2010).

La réaction de Fenton peut convertir H_2O_2 en OH° en présence des métaux de transition (Cu^+ et Fe^{2+}) (voire réaction 1), ces ions métalliques oxydés sont ensuite réduits par l' O_2° (voire la

réaction 2). Aussi l' OH° peut être formé par la réaction de Haber-Weiss (voire réaction 3) (Gill et Tuteja, 2010).



Les métaux non réactifs ont la capacité de provoquer un stress oxydatif, ces ions métalliques inhibent l'activité des enzymes antioxydants et accumulent les ROS (Schützendübel et Polle, 2002).

6. Antioxydants

Un antioxydant est une substance chimique diminuant le stress oxydant dans l'organisme vivant, sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres, en piégeant directement les ROS générés par les métaux lourds intracellulaires. Selon le mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories : enzymatiques et non enzymatiques (Desmier, 2016 ; Soufane et *al.*, 2018).

6.1 Antioxydants enzymatiques

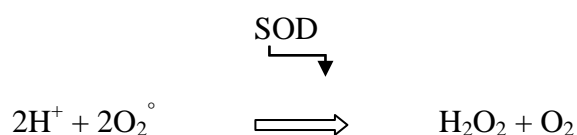
Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense, qui fait la diminution de la quantité des ROS présente dans la cellule. Ces antioxydants utilisent les oligoéléments tels que Cu, Fe, Mn et Zn comme des cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique (Garait, 2006 ; Karouche, 2017). (**Voir Tableau 4**).

Tableau 4 : Les majeurs antioxydants enzymatiques (Gill et Tuteja, 2010).

Antioxydants enzymatiques	Code d'enzyme
Superoxyde dismutase (SOD)	EC 1.15.1.1
Catalase (CAT)	EC 1.11.1.6
Ascorbate peroxydase (APX)	EC 1.11.1.11
Guaicol peroxydase (GPX)	EC 1.11.1.7
Monodehydroascorbate réductase (MDHAR)	EC 1.6.5.4
Dehydroascorbate réductase (DHAR)	EC 1.8.5.1
Glutathion réductase (GR)	EC 1.6.4.2

6.1.1 Superoxyde dismutase "SOD" (EC 1.15.1.1)

Les SOD sont les premières enzymes entrant dans la cascade des ROS. Ce sont des métalloprotéines qui ont la capacité d'éliminer l'anion superoxyde par une action de dismutation (voire la réaction) (Hocine et Gorine, 2017 ; Saida, 2017).



Selon leur localisation cellulaire et leur cofacteur métallique, trois isoformes sont distinguées ; Cu / Zn-SOD dans le cytosol et au niveau des liquides extracellulaires, Mn-SOD et Fe-SOD dans les mitochondries (Desmier, 2016).

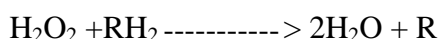
6.1.2 Catalase "CAT"(EC 1.11.1.6)

Selon Amandine (2016) « les catalases sont localisées dans les peroxysomes et leur cible principale est le H₂O₂. Cette place est stratégique puisque c'est ici que des enzymes comme les flavines, l'urate oxydase, les glucoses oxydases et les D-amino-oxydases

produisent le radical libre H_2O_2 . L'activité de la catalase est corrélée avec la concentration en H_2O_2 ».

6.1.3 Peroxydase "POD"(EC 1.11.1.7)

Les peroxydases de classe III (POD) est une hémoprotéine, qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par de nombreux substrats, tels que les composés phénoliques et les précurseurs de lignine (voire équation) (Halušková et *al.*, 2009).



La POD est impliquée dans plusieurs processus physiologiques : la lignification et la synthèse de la paroi cellulaire, le catabolisme des auxines et la défense contre le stress environnemental (Halušková et *al.*, 2009).

La détoxification des métaux se fait aussi par deux enzymes ; la glutathion S-transferase (GST) et la phytochélatine synthase (PCS) (Benhamdi, 2014).

6.2 Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques ont la capacité de piéger les radicaux libres par la rupture de la chaîne de réaction radicalaire. Les principaux antioxydants non-enzymatiques sont le glutathion, les vitamines (vitamine E, vitamine C), les oligoéléments (Cuivre, Fer, Manganèse, Sélénium et Zinc), les polyphénols (flavonoïdes), les caroténoïdes et l'acide urique (Smine, 2017).

6.2.1 Glutathion (GSH)

Le GSH est un tripeptide avec un groupement thiol, il est présent sous sa forme réduite dans les tissus des végétaux et joue un rôle principal dans le système antioxydant, y compris la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonction thiols (R-SH), aussi il piège le H_2O_2 et réagit avec l' O_2 et le radical hydroxyle (Gill et Tuteja, 2010 ; Karouche, 2017).

6.2.2 Vitamines

Généralement l'activité antioxydante des vitamines repose directement sur le piégeage des radicaux libres (vitamine C et E), ou de façon indirecte par la régulation et l'expression d'enzyme inductible oxyde nitrique synthase (iNOS) (Vertuani et *al.*, 2004).

La vitamine E (Tocophérols) est un antioxydant membranaire liposoluble, elle agit contre les ROS et plus particulièrement dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Gill et Tuteja, 2010).

La vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant hydrosoluble, présente dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire, elle renforce les défenses naturelles de l'organisme par le piégeage de l' O_2° et l' OH° et la réduction de radicaux α -tocophérol pour obtenir une très bonne efficacité de la vitamine E (Garait, 2006).

6.2.3 Oligoéléments

Les oligoéléments sont des nutriments essentiels à la vie d'un organisme, qui participent dans la défense contre les ROS tel que ; Cu, Fe, Mn, Se et Zn. Cependant, le fer est l'oligoélément le plus abondant dans l'organisme lorsqu'il est présent en excès et sous sa forme réduite, peut être un prooxydant (Garait, 2006).

6.2.4 Proline

La proline est un antioxydant non enzymatique, elle agit contre les ROS (OH° et O_2°) formés lors d'un stress salin, métallique ou lors d'une déshydratation (Rejeb et *al.*, 2012). Siripornadulsil et *al.* (2002) ont rapporté que le taux de la proline libre est en corrélation avec l'état redox du GSH et les taux du MDA dans les algues traitées avec le cadmium. Ces résultats montrent que la proline libre agit comme un antioxydant dans les cellules stressées par le cadmium.

7. Endophytes

Les endophytes ont été découverts au début du 19^{ème} et 20^{ème} siècle (Staniek et *al.*, 2008). En 1866, Anton de Bary, est le premier chirurgien botaniste qui a utilisé le terme "endophyte", qui est composé de deux mots grecs ; "*endon*" signifie "dans" et "*phyton*" signifie "plante", pour désigner les microorganismes qui colonisent les tissus internes des végétaux (Fadhela, 2017).

Généralement les endophytes sont classés en fonction de leur type d'organisme (bactéries, champignons et algues) et leurs modes de colonisation des plantes facultatifs ou obligatoires (Kumar et Radhakrishnan, 2020) telles que ; le parasitisme, le mutualisme, le commensalisme ou encore la symbiose (Repussard et *al.*, 2013).

Synthèse bibliographique

Petrini (1991) a défini les endophytes comme étant tous les microorganismes vivants dans les organes végétaux internes à un moment de leur vie, sans causer de dommages apparents chez la plante hôte (Hyde et Soyong, 2008).

7.1 Champignons endophytes

Les champignons sont les microorganismes les plus connus étant des endophytes. Ces espèces forment un groupe polyphylétique très diversifié, majoritairement issues du phylum "Ascomycota", ils peuvent croître de façon asymptomatique dans les tissus interne des plantes. Les endophytes fongiques sont ubiquistes ; c'est-à-dire sont présents dans toutes les espèces de plantes (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

Chez les champignons endophytes deux modes de transmission ont été observés : la transmission verticale "asexuée" et la transmission horizontal "sexuée ou asexuée" (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016), ces microorganismes ont été découverts il y a plusieurs décennies, mais dans les dernières années les chercheurs ont commencé à s'intéresser aux endophytes (Moricca et Ragazzi, 2008), ils sont considérés comme des sources de plusieurs biomolécules d'intérêt telles que les antibiotiques, les antioxydants, les anticancéreux et les insecticides (Zerroug, 2018).

Selon la famille de l'endophyte concerné, sa localisation dans les tissus de l'hôte et son mode de transmission, les endophytes sont divisés en quatre classes qui sont décrite dans le **tableau 5** suivant.

Tableau 5 : La classification des endophytes fongiques (Rodriguez et *al.*, 2009).

Critères	Clavicipitacés		Non Clavicipitacés	
	Classe 1	Classe2	Classe3	Classe4
Gamme d'hôtes	Large	Etroite	Etroite	Etroite
Tissus colonisés	Tige et Rhizome	Tige, Rhizome et Racines	Tige	Racine
Colonisation, dans la plant	Etendue	Etendue	Limitée	Etendue
	Basse	Basse	Haute	Inconnue
Biodiversité des plants	Verticale et Horizontale	Verticale et Horizontale	Horizontale	Horizontale
Transmission	NHA	NHA et HA	NHA	NHA
Bénéfice*				

*Nom habitat-adapted (NHA), habitat-adapted (HA)

Synthèse bibliographique

En 1934, le botaniste belge Raoul Mosseray est le premier qui a décrit *Aspergillus tubingensis* (Bathoorn et al., 2013), c'est un champignon filamenteux noir appartient à la section d'*Aspergillus nigri* de la famille Trichocomaceae (**figure 12**). *Aspergillus tubingensis* ressemble morphologiquement à *Aspergillus niger* (Nadumane et al., 2016). Cette espèce est ubiquitaire, elle se développe sur le matériel végétal mort, principalement dans les climats chauds et les zones tropicales à large gamme de températures, avec un optimum 21°C et 36°C et un pH entre 2-7 (Bathoorn et al., 2013 ; Lilia et al., 2019).

Il pousse sur deux milieux ; la gélose à l'extrait de malt (MEA) et le milieu Czapek supplémenté d'extrait de levures (CYA) à 25°C pendant 7 jours (**figure 11**) donne des colonies noires de diamètre 56 -57 mm avec des têtes cnidiennes ; brune grisâtre ou entre brune grisâtre et brune foncé avec un revers blanc crème sur le MEA et des colonies noires de diamètre 65-72 mm avec un revers pâle sur CYA (Silva et al., 2011 ; Khan et al., 2017). Il a deux formes de reproduction, sexuée elle se fait par l'accouplement entre deux hétérothalliques de type opposé (Horn et al., 2013), d'autre part la reproduction asexuée se fait par la germination des spores pour donner un nouveau mycélium (Sénéquier-Crozet et Canard, 2016).

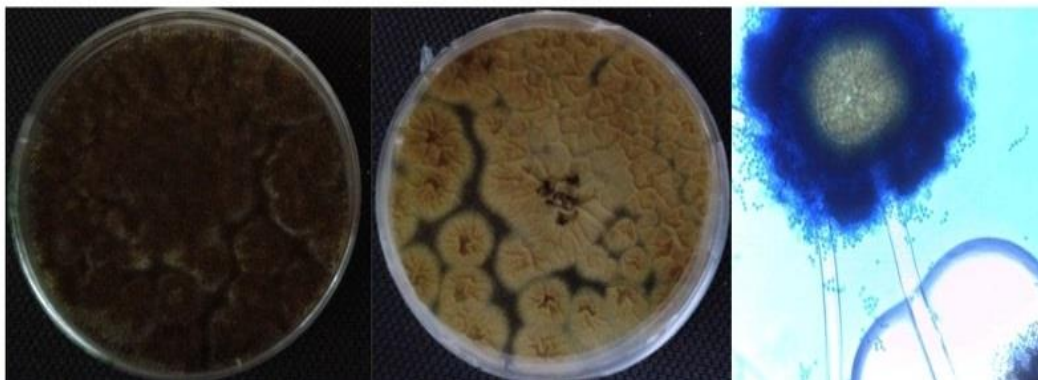


Figure 11 : Aspect macroscopique et microscopique d'*A. tubingensis* (Meghnous., 2020).

De nombreux métabolites secondaires sont produits par *A. tubingensis* tels que l'acide citrique, l'acide ascorbique et naphtho-gamma-pyrones (NGP). Ces métabolites ont des propriétés biologiques d'intérêt industriel qui ont des capacités antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses. Le milieu spécifique pour la production de NGP est le milieu Czapek Dox Broth (CYB) (Lilia et al., 2019).

A.tubingensis responsable de plusieurs maladies graves chez les patients immunodéprimés parmi ces maladies ; la kératomyose aussi s'appelle " kératite mycosique ou fongique ", maladie pulmonaire obstructive chronique ou d'autres types d'insuffisance respiratoire chronique (Kredics et al., 2009 ; Gautier et al., 2016).

La littérature scientifique, a rapporté que *A. tubingensis* peut être un champignon endophyte, car il a été isolé à partir des racines de plusieurs espèces végétales, *Hedysarum pallidum* Desf. Par Meghnous et al. (2019), *Pongamia pinnata* par Huang et al. (2010), des racines de *Tetragonia tetragonoides* par You et al. (2016), des tissus de mangroves par Bacal et Yu (2017) et également *A. tubingensis* (KJ476743.1) par Ma et al. (2015) des racines de *Lycium ruthenicum*.

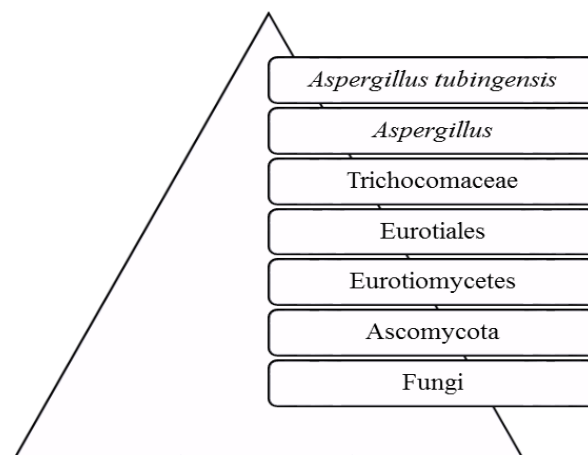


Figure 12 : Classification d'espèce *Aspergillus tubingensis* (Mosses R., 1934).

7.2 Bactéries endophytes

Les bactéries endophytes sont omniprésentes chez la plupart des espèces végétales, qui colonisent les tissus internes des plantes, sans dommage visible, car ces bactéries ont été considérées comme des phytopathogènes peu virulents (Chriet et Belhi, 2014). Elles sont issues de la sous-classe des bactéries rhizosphériques, habituellement appelées "rhizobactéries" (Afzal et al., 2019). Cependant, les bactéries colonisant les plantes sont en nombre relativement faible par rapport à d'autres espèces microbiennes (Gnanamanickam, 2007), mais elles présentent des effets bénéfiques pour les plantes, en améliorant leur croissance dans les conditions favorables ou défavorables, aussi pouvant utiliser des antibiotiques et des enzymes hydrolytiques telles que la cellulase et la pectinase, pour cibler les pathogènes tout en protégeant la plante (Afzal et al., 2019).

Synthèse bibliographique

En 1819, un phénomène survenait dans la semoule de maïs bouillie, qui consiste à un changement de couleur. À cet effet, le pharmacien Italien Bizio a identifié un pathogène nosocomial opportuniste qui est responsable de cette décoloration, qu'il nommait *Serratia marcescens*, (**figure 13**) l'origine de cette nomenclature est extrait du nom de physicien Italien *Serratia* et *marcescens*, qui est un mot latin signifiant "pourrir "(Khanna et *al.*, 2013).

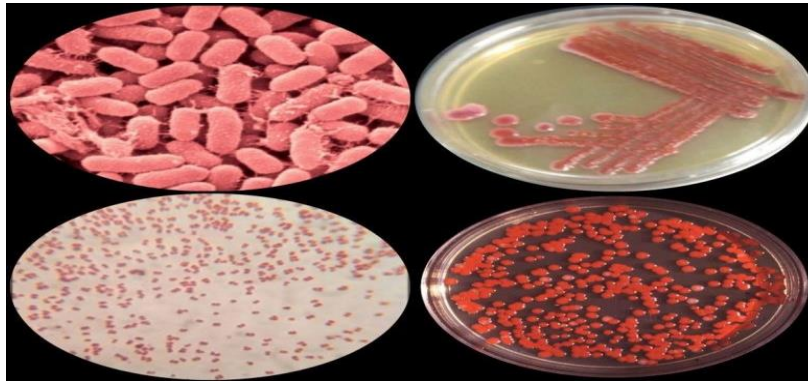


Figure 13 : Aspect macroscopique et microscopique de *Serratia marcescens*.
(Chander et *al.*, 2021 ; Benutzer: Brudersohn, 2005).

S. marcescens appartient à la famille des Enterobacteriaceae (**figure 14**), Cette dernière est un bacille à Gram négatif qui mesure 0.5-0.8 μm de diamètre et de 0.9-2 μm de longueur, mobile par ciliature péritriche, asporulée et acapsulée mais certaines espèces peuvent être capsulées (Batah, 2016).

L'identification de *S. marcescens* repose sur des caractères biochimiques et culturels, ces espèces sont aéro-anaérobie facultatives, cultivant dans des milieux d'isolement pour les entérobactéries telles que ; Trypticase Soja, MacConkey, Hektoon, Luria Bertani.

Généralement, après 24 heures à 30-40 °C une apparition de colonies opaques, circulaires et convexes est constatée sur la gélose nutritive d'un diamètre de 1-3 mm. Les caractères biochimiques de *S. marcescens* sont illustrés dans le tableau 06 (Batah, 2016).

Tableau 6 : Caractères biochimiques et cultureux d'indentification de *S. marcescens*
(Mahlen, 2011 ; Batah, 2016).

Caractéristiques	<i>S. marcescens</i>
DNase	+
Gélatinase	+
Lipase (Hydrolyse de tween80)	+
Production de la prodigiosine	Variable
L'odeur de la pomme de terre	-
Indole	-
Urèase	-
Arginine dihydrolase ADH)	-
Lysine décarboxylase (LDH)	+
Ornithine décarboxylase (ODC)	+
Fermentation d'I-Arabinose	-
Fermentation de lactose	-
Fermentation de d-Sorbitol	+
Fermentation de sucrose	+
Oxydase	-
Catalase	+
Voges-Proskauer VP	+
L'orthonitrophényl-β-galactoside ONPG	+
Tryptophan Deaminase TDA	-
Hydrogène sulfuré H ₂ S	-

Synthèse bibliographique

S. marcescens peut produire un pigment non diffusable d'une couleur rose à rouge vif appelé "la prodigiosine" (Giri et al., 2004) et aussi capable de produire la bêta-lactamase qui lui donne une résistance a spectre large (Khanna et al., 2013).

S. marcescens est une espèce aquatique saprophyte inoffensive ubiquitaire qui se trouve dans la nature, les environnements hospitaliers et le matériel médical à température optimale +4°C. Cette bactérie est rarement pathogène, elle est responsable des infections nosocomiales (le taux de mortalité est très élevé dans les infections nosocomiales du sang), qui se limite aux voies respiratoires et urinaires, dans le service pédiatrie *S. marcescens* est la cause de de la méningite (Khanna et al., 2013).

IL est à noter que *Serratia marcescens* peut être considérée comme une bactérie endophyte, car beaucoup d'auteurs ont isolés cette bactérie à partir de différentes parties de plusieurs espèces végétales, des fleurs de courge de *Cucurbita pepo* par Selvakumar et al. (2008), des feuilles d'*Achyranthes aspera* par Devi et al. (2016), des racines de *Solanum nigrum* par Khan et al. (2017), des racines de *Maytenus serrata* par Eckelmann et al. (2018), et des racines d' *Hedysarum pallidum* Desf. par Kassa-Laouar et al. (2020).

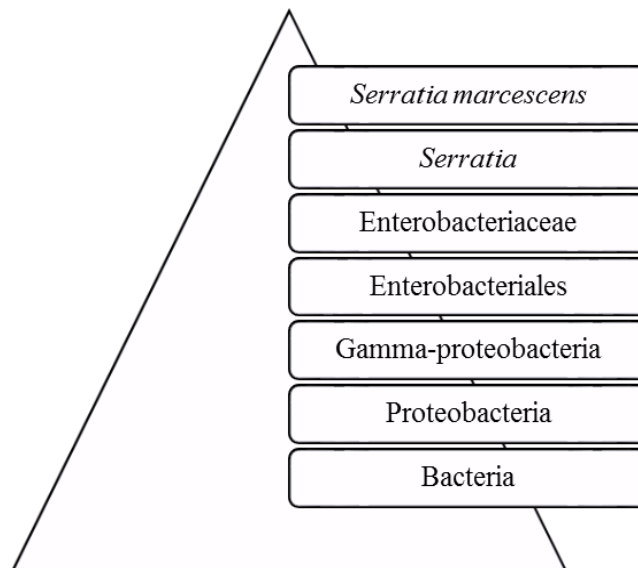


Figure 14 : Classification de l'espèce *Serratia marcescens* (Brenner, 2005).

Matériel et méthode

1 Objectif

Ce travail est une étude comparative de deux travaux de recherches de Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020), dont l'objectif est de comparer l'impact de l'antimoine sur *Serratia marcescens* et *Aspergillus tubingensis* aussi l'activité antioxydante des deux endophytes pour la bioremédiation des sols contaminés par l'antimoine.

2 Description du matériel biologique

Les auteurs Meghnous *et al.* (2019) ; Kassa-Laouar *et al.* (2020) ont isolé deux endophytes microbiens à partir des racines saines d'une plante steppique *Hedysarum pallidum* Desf. qui est une plante vivace hyperaccumulatrice de métaux lourds, elle pousse sur des déblais de mine contenant divers métaux toxiques principalement l'antimoine et l'arsenic avec des teneurs allant jusqu'à 62000 mg kg⁻¹ en Sb, et 2300 mg kg⁻¹ en As (Benhamdi *et al.* , 2014; Bentellis *et al.*, 2014).

Les analyses microbiologiques faites par les auteurs cités précédemment ont démontré qu'*H. pallidum* Desf. héberge dans ses racines plusieurs espèces microbiennes, dont un mycoendophyte tolérant 500 mM Sb identifié comme étant *Aspergillus tubingensis*, par comparaison des séquences du gène Calmodulin avec les espèces apparentées du *GenBank* (Meghnous *et al.*, 2019) et un endophyte bactérien résistant jusqu'à 450 mM Sb identifié comme *Serratia marcescens* sur la base des tests macroscopiques, microscopiques, biochimiques et moléculaires (Kassa-Laouar *et al.*, 2020).

3 Préparation des biomasses microbiennes pour les analyses des biomarqueurs de toxicité

Initialement, des inoculums microbiens ont été préparés. Une préculture de 24 h (contenant environ 4 x 10⁵ UFC) à 30° C sous agitation de 175 rpm, a été obtenue à partir de *S. marcescens*, sur le milieu LB exempt de métal, de même pour *A. tubingensis*, qui a étéensemencé sur gélose Sabouraud sans métal, à 28° C pendant 96 h.

Les biomasses bactériennes et fongiques ont été obtenues respectivement à partir des cultures submergées à 30°C / 175 rpm, des inoculats préalablement préparés des endophytes les plus résistants sur les bouillons : LB (pH=7) pendant 24h et Sabouraud (pH=6.4) pendant 96h, supplémentés par des doses croissantes en Sb (III) à savoir : 0, 5, 10,20 et 30 mM. (Meghnous *et al.*, 2019 ; Kassa-Laouar *et al.*, 2020).

La biomasse de *S. marcescens* a été récupérée après 24h d'incubation par une série de centrifugations, quant à la biomasse d'*A. tubingensis* a été filtrée sur papier Watman n°01, ces étapes permettent d'éliminer les résidus des milieux de culture. Ces biomasses servent pour les analyses des biomarqueurs antioxydants (Meghnous *et al.* , 2019 ; Kassa-Laouar *et al.*, 2020).

4 Mesure des biomarqueurs de toxicité

4.1 Préparation de l'extrait enzymatique

Les aliquotes enzymatiques ont été réalisés selon la méthode décrite par Mukherjee *et al.* (2010) et Benhamdi *et al.* (2014), 0,5g de la biomasse microbienne (bactérienne et fongique) fraîche a été broyée dans l'azote liquide. Les protéines ont ensuite été extraites à 4 °C avec 3 ml de tampon phosphate de potassium froid (50 mM, pH 7,0) contenant 0,1% de triton X-100 (v: v) et 1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) (w: v). L'homogénat a été centrifugé à 14000×g à 4 ° C pendant 15 min et le surnageant a été utilisé pour mesurer les activités antioxydantes (Meghnous *et al.*, 2019 ; Kassa-Laouar *et al.*, 2020).

4.2 Teneur intracellulaire en H₂O₂

La teneur de H₂O₂ a été mesurée selon la méthode décrit par Chakraborty *et al.* (2014), la biomasse microbienne (bactérienne et fongique) a été homogénéisée dans un bain de glace avec 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 0.1% (w : v). L'homogénat est centrifugé à 12000×g pendant 15 min. 0,5mL du surnageant est ajouté à 10 mL de tampon phosphate 0,5 mM (pH 7,0) et 1 ml du KI 1M. L'absorbance est lue à 390 nm. Le taux de H₂O₂ est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage.

4.3 Mesure du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit final de la peroxydation lipidique. La teneur en MDA pour les souches fongiques a été dosée selon Benhamdi *et al.* (2014) ; dans laquelle 0.5g de la biomasse fraîche a été broyée dans l'azote liquide et homogénéisée avec une solution de 5 ml contenant 20% de TCA et 0.5% d'acide thiobarbiturique (TBA). Pour la souche bactérienne le MDA a été analysé après Chakraborty *et al.* (2013) ; dans laquelle 0.5 ml de l'extrait enzymatique (voir section préparation des aliquotes enzymatiques) a été ajoutée à 1 ml de TCA à 20% (p/v) et 0.5%(p/v) de TBA.

Les mélanges ont été incubés à 95 °C pendant 30 minutes et la réaction a été arrêtée en plaçant les tubes dans des bains de glace. Les mélanges refroidis fongiques et bactériens ont été centrifugés à 5000×g et 10 000×g respectivement pendant 10 min. L'absorbance non spécifique du surnageant à 600 nm a été soustraite de l'absorbance à 532 nm. Et la concentration en MDA a été calculée en utilisant l'absorbance ajustée et le coefficient d'extinction molaire 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

5 Dosage des activités enzymatiques antioxydantes

5.1 Activité de Catalase (CAT)

L'activité de la catalase (CAT) a été mesurée selon la méthode rapporté par Chance et Maehly (1955). La décomposition du peroxyde d'hydrogène a été suivie par la mesure de la diminution de l'absorbance à 240 nm toutes les minutes pendant les trois premières minutes de la réaction. L'activité CAT a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ et l'activité spécifique a été donnée en μM min⁻¹ - 1 mg⁻¹ - protéines.

5.2 Activité de Superoxyde Dismutase (SOD)

L'activité de la SOD a été évaluée selon la méthode décrite par Marklund et Marklund (1974) par sa capacité à inhiber l'autoxydation du pyrogallol à 420 nm. L'unité SOD a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer une inhibition de 50% de l'autoxydation du pyrogallol. L'activité de la SOD est exprimée en Unité/mg de protéine.

Discussion

Les endophytes bactériens et fongiques, qui révèlent l'impact de l'antimoine sur les populations microbiennes cultivables des sols, sont les moins abordés parmi les études menées dans ce domaine (Singh et *al.*, 2015).

L'antimoine est le métalloïde le moins distribué dans l'environnement, contrairement à l'arsenic (Wang et *al.*, 2010). En effet, l'attention sur ce polluant (Sb) est presque inexistante. Mais au cours des 30 dernières années, ce métalloïde est devenu un polluant très répandu.

Selon Mubarak et *al.* (2015), la contamination des sols par Sb, due aux activités humaines, a considérablement augmenté et constitue une grave menace pour la santé humaine, pour d'autres organismes vivants et l'environnement. Le développement des biotechnologies d'élimination de Sb des sites contaminés est donc nécessaire (Meghnous, 2020).

De ce fait, le présent travail a été mené pour comparer l'activité antioxydante de *Serratia marcescens* et *Aspergillus tubingensis* pour la bioremédiation des environnements contaminés par l'antimoine.

La figure 15, montre que les réponses cellulaires d'*A. tubingensis* et *S. marcescens* aux doses croissantes de Sb dans le milieu de culture sont similaires, ceci a été mis en évidence par la diminution significative de la biomasse fongique et le taux de la croissance bactérienne en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb dans les milieux. Cette diminution peut s'expliquer par la modification des mécanismes physiologiques des souches en réponse à la toxicité du milieu.

En effet, les doses métalliques élevées induisent chez les bactéries des modifications morphologiques, une inhibition de la respiration, une réduction de la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques et/ou une altération de l'activité de certaines enzymes (Kassa-Laouar, 2020). De même chez les champignons les concentrations subléthales en métaux lourds provoquent une perturbation dans la perméabilité membranaire et par conséquent une perte importante de nutriments essentiels à la croissance fongique, aussi elles affectent la taille, la diversité et l'activité de la population microbienne ainsi que leur structure génétique (Chakraborty et *al.*, 2012, 2014).

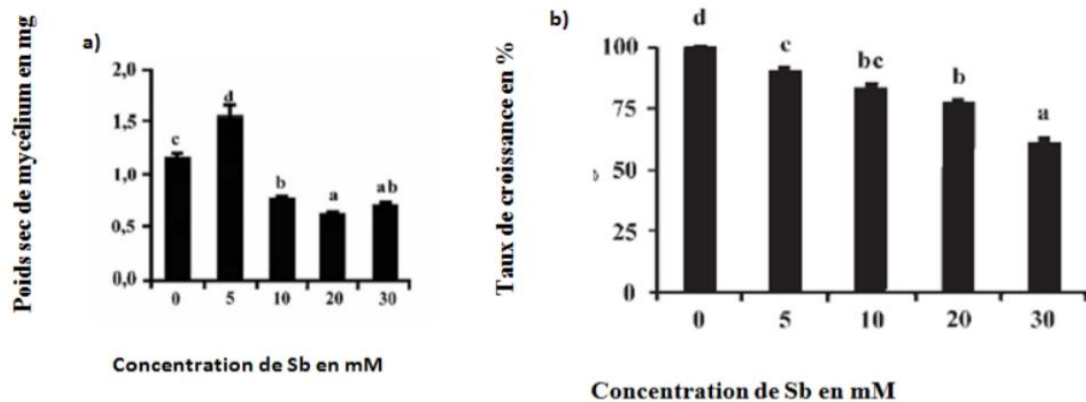


Figure 15 : Taux de croissance d'*A. tubingensis* (a) et de *S. marcescens* (b) en fonction des concentrations de Sb Meghnous et al. (2019) et Kassa-Laouar et al. (2020).

La réduction du taux de la croissance fongique d'*Aspergillus tubingensis* exposé à des doses importantes en Sb était similaire à la réponse fongique obtenue par *Aspergillus nidulans* en présence du Cd par Guelfi et al. (2003), *Aspergillus fumigatus* en présence du Cd par Al- Garni et al. (2009), *Aspergillus tamarii* en présence de (Cd, Co, Ni et Pb) par Abd El-Mongyet El-Ghany. (2009), *Aspergillus foetidus* en présence de Pb par Chakraborty et al. (2013) et *Aspergillus fumigatus* en présence du Cd par Krumova et al. (2009).

Cette réduction du taux de croissance notée chez *S. marcescens* obtenue par Kassa-Laouar et al. (2020) est similaire à la réponse obtenue par *S. marcescens* en présence de Cr et Pb par Cristani et al. (2012), *S. marcescens* AQ07 en présence de Mg par Ibrahim et al. (2014), *S. marcescens* S2I7 en présence du Cd par Kotoky et al. (2019) et *S. marcescens* BM1 en présence du Cd par El-Esawi et al. (2020).

Ezzouhri et al. (2009) ont signalé qu'un prolongement de la phase de latence c'est-à-dire une réduction de la croissance chez les espèces fongiques a été observé en présence des concentrations croissantes aux métaux testés (Cd, Cr, Cu, Pd et Zn). De même, les travaux de Tsekova K et al. (2000) ont montré que la réduction de la croissance d'*A. niger* causée par le Cd et le Cu est accompagnée par une diminution de la production d'ADN et des protéines.

Selon Behera et al. (2014) la réduction de la croissance de *Bacillus cereus* peut être due à l'inhibition de la division cellulaire normale par le cuivre. A cet égard, Choudhary et al. (2007), ont relevé que la croissance de *Spirulina platensis*-S5a été réduite en présence des métaux, le Pb induit un jaunissement et une fragmentation des filaments, et le Cu réduit

Beaucoup d'auteurs rapportent que des doses importantes en ions métalliques stimulent la croissance de certains microorganismes, ce qui a été constaté chez *A. tubingensis* à 5 mM Sb, or, la concentration de 5 mM, soit 609 mg kg⁻¹ est relativement élevée car les niveaux normaux de Sb dans les sols sont inférieurs à 8 mg kg⁻¹ (Clemente 2013). Ce résultat est similaire à celui de Neijssel et *al.* (1990) qui ont révélé que l'antimoine à une concentration de 5 ppm stimule la production cellulaire de deux bactéries, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* mieux qu'à 1 ppm.

Nous constatons qu'*A. tubingensis* et *S. marcescens*, ont préservé une croissance importante à 30 mM Sb comparativement au témoin (C₀) (**figure 15**), ceci peut s'expliquer par l'adaptation des deux souches à des niveaux excessifs de Sb. Il est important de rappeler que ces deux microorganismes proviennent des racines d'une plante hyperaccumulatrice d'antimoine qui pousse dans une zone riche en métaux.

Ce résultat est en concordance avec de nombreux travaux rapportant que des concentrations faibles en métaux stimulent la croissance fongique, citons : Ge et *al.* (2011) pour *Aspergillus foetidus* en présence de multi-métaux (Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni et Zn), Ahmad et *al.* (2015) pour l'*Aspergillus niger* en présence de cadmium, Marcos et *al.* (2015) pour *Aspergillus niger* en présence de Cuivre et Tkaczuk et *al.* (2019) pour *Isaria farinosa* en présence de Zn.

La toxicité de l'antimoine dans le milieu de culture a induit une formation des espèces réactives d'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène. L'H₂O₂ est un sous-produit inévitable de tous les organismes vivants aérobique pour la production de l'énergie. Par rapport à d'autre ROS, l'H₂O₂ est moins toxique mais il est considéré comme une molécule délétère qui endommage l'intégrité cellulaire (Li et *al.*, 2008 ; Gauron et *al.*, 2016).

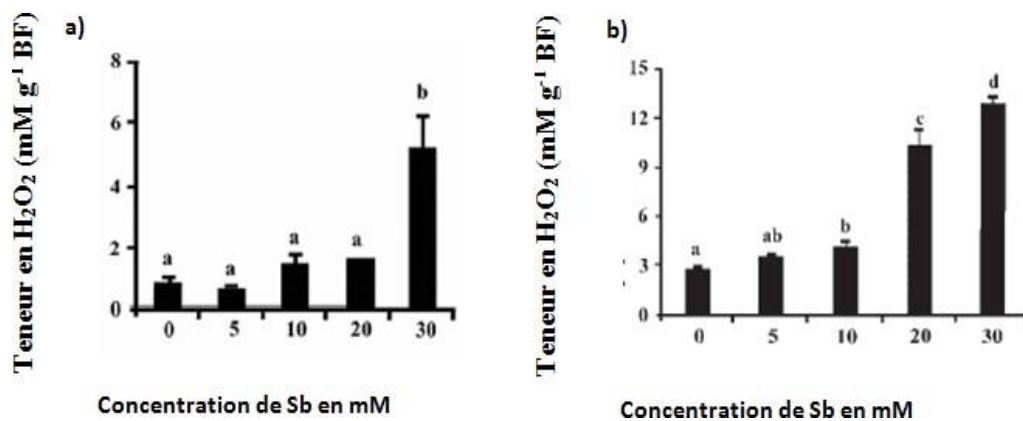


Figure 16 : Teneurs intracellulaires en H₂O₂ chez *A. tubingensis* (a) et *S. marcescens* (b) en fonction des concentrations de Sb Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020).

La littérature scientifique rapporte que le H₂O₂ est généré dans les cellules dans des conditions normales ainsi que dans des conditions de stress. D’après les résultats obtenus par Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020), nous remarquons que les teneurs intracellulaires en H₂O₂ d’*A. tubingensis* et *S. marcescens* augmentent avec l’accroissement des doses de Sb dans le milieu de culture (**figure 16**), or aux conditions normales les deux espèces répondent de la même façon notons une concentration de 1 et 2,5 mM g⁻¹ en H₂O₂ pour *A. tubingensis* et *S. marcescens* respectivement.

A 30 mM Sb, *A. tubingensis* et *S. marcescens* accumulent des teneurs importantes en H₂O₂ atteignant respectivement 5 et 13 mM g⁻¹

L’augmentation de la teneur intracellulaire en H₂O₂ a été induite par la présence des concentrations importantes de Sb dans les milieux de culture, ceci s’explique par une réponse oxydative d’*A. tubingensis* et *S. marcescens* qui s’est traduite par la formation des ROS dont le H₂O₂, suite à leur exposition à ce métalloïde (Kassa-Laouar, 2020).

Ces résultats sont similaires aux travaux de Chakraborty *et al.* (2014) pour *Aspergillus foetidus* en présence de Pb (II) et Cd (II), aussi aux travaux de Behera *et al.* (2014) pour *S. marcescens* et *Bacillus cereus* en présence de Cu et Cd et Wang *et al.* (2020) chez *Sphingomonas* SaMR12 en présence de Cd.

Lorsque le H₂O₂ est présent dans la cellule, il entraîne une peroxydation des acides gras

polyinsaturés pour donner un produit fini qui est le malondialdéhyde (MDA). Le MDA est le biomarqueur le plus étudié pour déterminer un stress oxydant chez les individus exposés aux métaux lourds (Charissou *et al.*, 2004 ; Kornobis-Chérot, 2012).

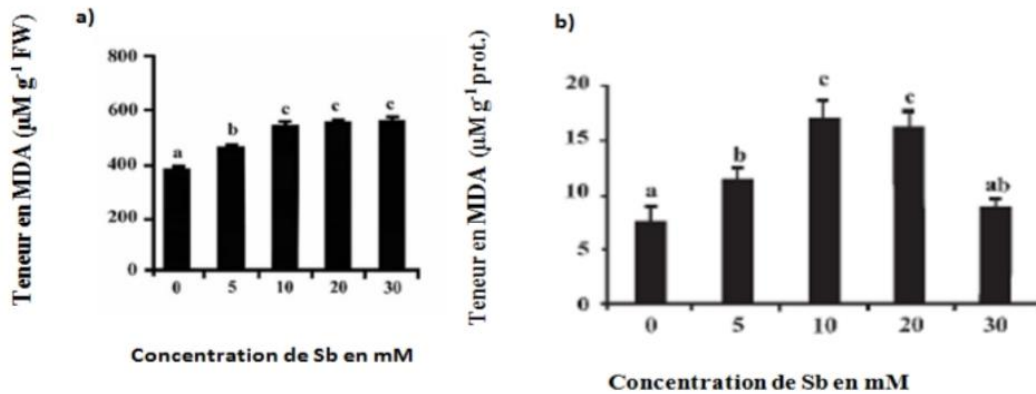


Figure 17: Contenu en MDA chez *A. tubingensis* (a) et *S. marcescens* (b) en fonction des concentrations de Sb Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020).

Les analyses faites par les auteurs corroborent la littérature scientifique, ceci a été mis en évidence par l'augmentation significative des teneurs en MDA avec l'augmentation des doses de Sb dans le milieu pour *A. tubingensis* et *S. marcescens*.

D'après la figure 17, nous constatons que les réponses oxydatives des deux endophytes microbiens sont similaires, notant des augmentations des teneurs en MDA avec les doses croissantes de Sb hormis à 30 mM Sb, à cette haute concentration en Sb, *S. marcescens* (**figure 17 b**) a marqué une diminution de la teneur en MDA, cette réduction peut s'expliquer par la production importante du H_2O_2 qui entraîne une altération des fonctions métaboliques de la souche.

Une telle augmentation était à l'origine d'une intensification du stress généré par la présence d'autres ROS que H_2O_2 , en déclenchant la peroxydation des AGPI et donc une production accrue de MDA. Ceci provoque une altération des propriétés biochimiques des biomolécules notamment celles de la membrane ; ce qui conduit à la diminution de sa fluidité, à la perte de sa fonctionnalité de transport particulièrement des nutriments, à la perte de la régulation de la balance osmotique et à l'inactivation des ATPases (Alberts *et al.*, 2012), et entraîne ainsi la réduction de la croissance des deux souches.

L'accumulation du MDA en présence des ions métalliques a été rapportée chez plusieurs microorganismes à savoir *Aspergillus niger* en présence d'arséniate (Mukherjee et al., 2010), *Spirulina platensis*-S5 en présence de Cu, Pd et Zn (Choudhary et al., 2007), *Saccharomyces cerevisiae* en présence du Cd (Muthukumar et Nachiappan, 2010) et *Enterobacter cloacae* en présence du Pd et Ni (Banerjee et al., 2015).

D'après Kassa-Laouar (2020), la catalase joue un rôle important dans la détoxification du H₂O₂ pendant un stress oxydatif puisqu'elle l'élimine par sa conversion en H₂O.

L'étude comparative des travaux de Meghnous et al. (2019) et Kassa-Laouar et al. (2020) révèle une stimulation significative de l'activité de la catalase (CAT) avec les traitements de Sb pour les deux endophytes microbiens, notant que la réponse de *A. tubingensis* est 10 fois plus voire 20 fois plus la réponse *S. marcescens* pour toutes les concentrations métalliques.

A 20 mM Sb *S. marcescens* atteint une activité maximale de la CAT avec 1,6 µmol/min/mg de Prot, cette activité reste non significative par rapport à la réponse de l'endophyte fongique à la plus faible concentration en Sb (**figure 18**)

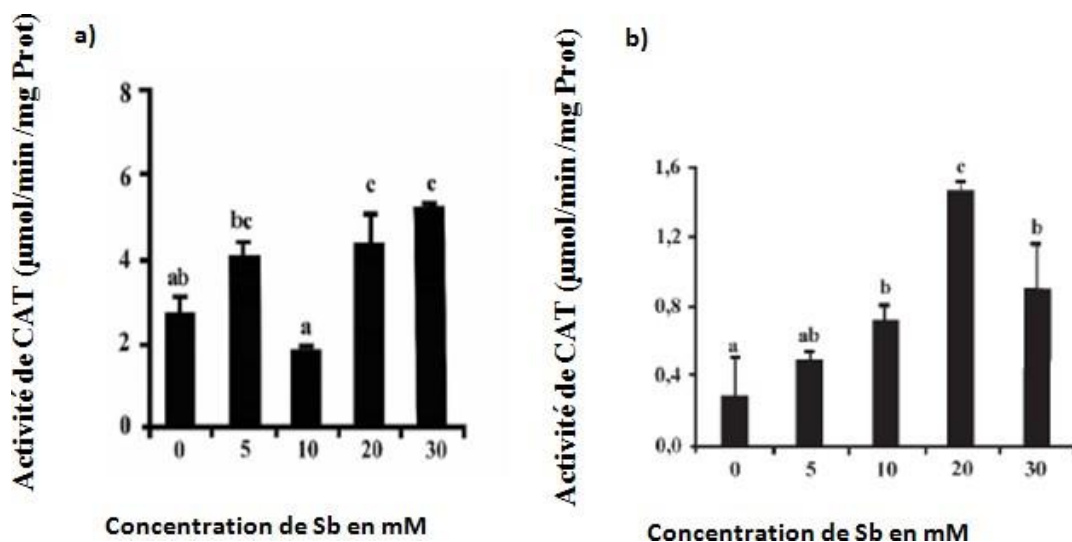


Figure 18 : Activités de la CAT d'*A.tubingensis* (a) et *S.marcescens* (b) en fonction des concentrations de Sb Meghnous et al. (2019) et Kassa-Laouar et al. (2020)

Nous expliquons cet accroissement de la CAT par rapport à l'augmentation de la concentration de son substrat, le peroxyde d'hydrogène, suite à l'augmentation de la concentration des ions métalliques dans les milieux de culture, ce qui met en évidence

l'implication de cette enzyme dans la catalyse du H₂O₂ intracellulaire formé en présence de ce métalloïde.

Selon Polydoros et Scandalios (1999), l'activité de la catalase est directement régulée par les concentrations en H₂O₂ dans le milieu, où l'accumulation élevée peut réduire l'activité de la CAT, ce qui est constaté à 30 mM Sb chez *S. marcescens*.

Les résultats observés dans cette analyse sont cohérents avec ceux de Bucková M *et al.* (2005) en présence de As, Cd et Cu, de Chakraborty *et al.* (2012) pour *Aspergillus foetidus* MTCC 8876 en présence de Pb, et aussi chez *Aspergillus niger* en présence de Cu par Marcos *et al.* (2015) et Cavalcanti Luna *et al.* (2015).

De même avec ceux de Khalid et Jin, (2013) chez *Burkholderia cepacia* en présence du Cd, David *et al.* (2016) pour *Bacillus* sp en présence d'As, Cd et Zn, et El-Esawi *et al.* (2020) pour *S. marcescens* BM1 en présence de Cd.

Le superoxyde dismutase (SOD) est une autre enzyme antioxydante qui protège les cellules contre le stress oxydatif. D'après les résultats obtenus par Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020), nous notons que les activités de la SOD ont augmenté avec les doses de Sb dans les milieux de cultures (**figure 19**), dans lesquels les activités de la SOD chez *A.tubingensis* à 5, 10, 20 mM de Sb sont inférieures à 9 (U/mg de Prot) avec un maximum d'activité à 30 mM Sb de plus de 10 U/mg de Prot, or, pour *S. marcescens* les activités de la SOD dans les conditions normales c'est-à-dire à 0 mM de Sb sont supérieures à 10 (U/mg de Prot). Ceci suggère que la réponse de *S. marcescens* est nettement plus importante que celle d'*A.tubingensis*.

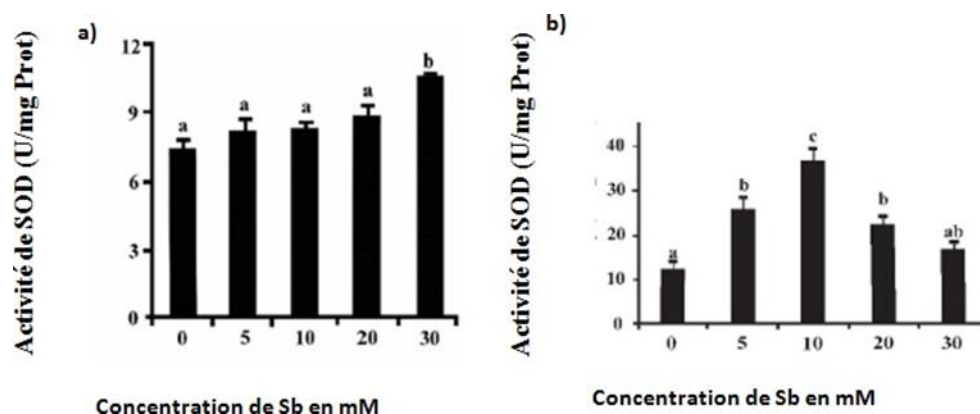


Figure 19 : Activités de la SOD d'*A. tubingensis* (a) et *S. marcescens* (b) en fonction des concentrations de Sb Meghnous *et al.* (2019) et Kassa-Laouar *et al.* (2020)

Chez *S. marcescens* l'activité de la SOD diminue à 20 et 30 mM de Sb jusqu'à ce qu'elle atteigne moins de 20 (U/mg de Prot) à cause de la sensibilité de l'enzyme à l'excès d' H_2O_2 produit dans les cellules comme constatée par de nombreux auteurs (**figure 19 b**).

Une telle augmentation des activités de la SOD dans les deux souches se justifie par l'augmentation de la concentration de son substrat, le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Car cette enzyme catalyse la dismutation de deux molécules de ce radical en oxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Sharma et al., 2012).

En outre, plusieurs travaux vont vers le même sens de ces résultats ; nous citons : Valix et al. (2001) pour *Aspergillus foetidus* et *Penicillium simplicissimum* en présence de Co, Fe, Mn et Ni, Guelfi et al. (2003) pour *Aspergillus nidulans* en présence de Cd, Corticeiro et al. (2006) pour *Rhizobium Leguminosarum* en présence de Cd, Todorova et al. (2008) pour *Aspergillus niger* B77 en présence de Cd(II), Krumova et al. (2015) pour *Aspergillus fumigatus* en présence de Cd, et aussi Ullah et al. (2019) pour *Solanum nigrum* L en présence de Cd et Caldeira et al, (2020) pour *Serratia fonticola* en présence de gallium (Ga) et indium (In).

En effet, la SOD et la CAT sont considérées comme des enzymes de piégeage, qui servent de première ligne de défense contre le stress oxydatif en empêchant l'accumulation de ROS (Abrashv et al., 2008).

Conclusion

La contamination des sols par l'antimoine provoque une modification de la végétation où les plantes hyperaccumulatrices seulement peuvent survie dans les sites contaminés. De ce fait, la plante *Hedysarum Pallidum* Desf héberge dans ses racines une microflore endophytique parmi celles-ci ; *Aspergillus tubingensis* et *Serratia marcescens*, ces souches sont capables de tolérer des doses élevées en antimoine à savoir 500 mM et 450 mM de Sb respectivement, cette différence est négligeable car les deux souches ont presque le même potentiel antioxydant pour lutter contre l'antimoine. La présence des concentrations excessives de Sb dans le milieu de culture des deux endophytes a provoqué une forte accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans leurs cellules, entraînant une peroxydation lipidique et donc une diminution de leurs croissances.

Malgré la toxicité du milieu, les endophytes microbiens possèdent des mécanismes de défense contre la toxicité de l'antimoine, elles favorisent la croissance de leurs plantes hôtes, diminuent la phytotoxicité de Sb, ainsi, elles participent à la protection de leur hôte en piégeant les ROS, qui, par la mise en place des systèmes de défense de biomolécules antioxydantes, dans lesquels des enzymes (CAT, SOD, ...) et des molécules non enzymatiques qui sont produites en réponse à l'excès de ROS.

Néanmoins, les travaux sur l'antimoine (Sb), un polluant jugé alarmant, reste inconnus. Ce travail mériterait d'être approfondi, par exemple en étudiant l'effet du stress de l'antimoine sur les cellules fongiques et bactériennes, par un profil SDS-PAGE des protéines cellulaires, par une analyse protéomique et si possible une analyse transcriptomique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abd El-Mongy M., El-Ghany T.M. 2009. Bioremoval of heavy metals in presence of oxalic and citric acid using *Aspergillus tamarii*, the Egyptian journal of experimental biology (Botany), 5(0): 53-58. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4173-z>

Abdalla A.N., Almaliki W.H., Mukhtar M.H., Anwar F., Shahid I., Menshawi S.A., Alsulimani T.S. 2016. Ameliorative influence of dietary dates on doxorubicin-induced cardiac toxicity. Pharmacology and Pharmacy, 7: 343-353. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2016.78042>

Abdelly C. 2006. Bioremédiation/Phytoremédiation. Université de tunis institut supérieur de l'éducation et de la formation continue, SN 232.

Abrashev R.I., Pashova S.B., Stefanova L.N., Vassilev S.V., Dolashka-Angelova P.A., Angelova M.B. 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. Canadian Journal Microbiology. 54(12): 977-83. <https://doi.org/10.1139/w08-091>

Afzal I., Shinwari Z.K., Sikandar S., Shahzad S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria :Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiological Research, 221: 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>

Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J. 2011. Microbes and Microbial Technology : Agricultural and Environmental Applications (1 ed). New York: Springer-Verlag, 516.

Ahmad M.M., Ali A., Khan M.A., Abdin M.Z. 2015. Biomolecular Characteristics of *Aspergillus niger* Under Cadmium Metal Stress. Environmental Processes, 2(1): 241-250. <https://doi.org/10.1007/s40710-014-0047-1>

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2012. L'essentiel de la biologie cellulaire (3 ed). Paris : Médecine sciences publications, Lavoisier, 730.

Al-Garni S., Ghanem K., Bahobail A. 2009. Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution. African Journal of Biotechnology, 8(17): 4163-4172. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i17.62347>

Alvarez P.J., Illman W.A. 2005. Bioremediation and Natural Attenuation :Process Fundamentals and Mathematical Models (1 ed). Wiley-Interscience, 622.

Atamer A., Bilici A., Yenice N., Selek S., Ilhan N., Atamer Y. 2008. The importance of paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid Peroxidation in Hepatosteatois. The Journal of International Medical Research, 36(4): 771-776. <https://doi.org/10.1177/147323000803600419>

Audion A.S. 2012. Panorama mondiale 2011 du marché de l'antimoine. Rapport public BRGM/RP-61342-FR, 82.

Bacal C.J.O., Yu E.T. 2017. Cellulolytic activities of a novel *Fomitopsis* sp. and *Aspergillus tubingensis* isolated from *Philippine mangroves*. *Philippine Journal of Science*, 146(4): 403-410.

Baldrian P. 2008. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils : Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*, 1(1): 4-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001>

Banerjee G., Pandey S., Ray A.K., Kumar R. 2015. Bioremediation of Heavy Metals by a Novel Bacterial Strain *Enterobacter cloacae* and Its Antioxidant Enzyme Activity, Flocculant Production, and Protein Expression in Presence of Lead, Cadmium, and Nickel. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(4): 91. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2359-9>

Barkay T Schaefer J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current opinion in microbiology*, 4(3): 381-323. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00210-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00210-1)

Batah R. 2016. Identification de profile de résistance de *Serratia marcescens* aux antibiotiques. Thèse de Doctorat: Microbiologie Appliquée. Annaba: Université Badji Mokhtar-Annaba, 143.

Bathoorn E., Escobar Salazar N., Sepehrkhoy S., Meijer M., De Cock H., Haas P.J. 2013. Involvement of the opportunistic pathogen *Aspergillus tubingensis* in osteomyelitis of the maxillary bone : A case report. *BMC Infectious Diseases*, 13(59). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-59>

Batty L.C., Dolan C. 2013. The Potential Use of Phytoremediation for Sites with Mixed Organic and Inorganic Contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3): 217-259. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604254>

Beaugelin-Seiller K., Granier- Laplas J. 2002. Antimoine 125 et environnement. Fiche radionucléide. Biological relevance. Wiley-VCH, Weinheim (Allemagne), 25.

Behera M., Dandapat J., Rath C.C. 2014. Effect of heavy metals on growth response and antioxidant defense protection in *Bacillus cereus*. Journal of Basic Microbiology, 54(11): 1201-1209. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300805>

Bellion M. 2006. Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique chez les champignons ectomycorhiziens par agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporium*. Thèse de Doctorat : Biologie Végétale et Forestière. Nancy : Université Henri Poincaré, Nancy I, 90.

Benabdallah I., Kouadra H. 2014. Impact du plomb ou du cadmium sur la croissance et sur quelques systèmes de détoxification d'une souche d'*Aspergillus* sp. Mémoire Master recherche; Microbiologie générale. Constantine: Université Frères Mentouri Constantine.

Benedetto D. 1997. Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, dossier SAM : les métaux lourds.

Benhamdi A. 2014. Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. en réponse à la pollution du sol par l'antimoine. Thèse de doctorat : Biochimie et Biotechnologie. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine, 104.

Benhamdi A., Bentellis A., Rached O., Du Laing G., Mechakra A. 2014. Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two Steppic plant species in an old antimony mining area. Biological Trace Element Research, 158(1): 96-104. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9917-7>

Bentellis A., Azzoug R., El Hadeff El Okki M., Rached O. 2014. Trace elements pollution from an abandoned mine and factors affecting Antimony concentrations in the Dahimine Wadi Bank soils (Northeast Algeria). Carpathian Journal of Earth and Environmental, 9(1) : 95-106.

Berthelot C. 2017. Les endophytes bruns septés dans les sols pollués aux éléments traces métalliques (ETM): caractérisation, effet sur les plantes et mécanismes de tolérance aux ETM. Thèse de doctorat: Écotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes. Lorraine: Université de Lorraine, 307.

Bothorel P. 2011. Implication du stress oxydant dans la biologie tumorale et intérêt d'une supplémentation en antioxydants au cours d'une chimiothérapie. Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : université de limoges, 110.

Boufligha K., Kissoum N., Menina A. 2013. Résistance bactérienne aux antibiotiques et aux métaux lourds. Mémoire de fin d'étude: Microbiologie. Jijel: université deJijel, 51.

Bourrelier P.H., Berthelin J. 1998. Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion (Rapport de l'académie des sciences N° 42), Paris : Lavoisier, 438.

Bucková M, Godocíková J, Simonovicová A., Polek B. 2005. Production of catalases by *Aspergillus niger* isolates as a response to pollutant stress by heavy metals. Current Microbiology, 50(4): 175-179. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4458-5>

Burford E.P., Hillier S., Gadd G.M. 2006. Biomineralization of Fungal Hyphae with Calcite (Ca CO₃) and Calcium Oxalate Mono-and Dihydrate in Carboniferous Limestone Microcoms. Geomicrobiology journal, 23(8): 599-611. <https://doi.org/10.1080/01490450600964375>

Caldeira J.B., Morais P.V., Branco R. 2020. Exploiting the biological response of two *Serratia fonticola* strains to the critical metals, gallium and indium. Scientific Reports, 10(1) : 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77447-7>

Carange J. 2010. Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection?. Mémoire de fin d'étude: Biophysique et Biologie cellulaire. Université du Québec, 125.

Cavalcanti Luna M.A., Vieira E.R., Okada K., Campos-Takaki G.M., Do Nascimento A.E. 2015. Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. Electronic Journal of Biotechnology, 18(6): 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.006>

Centre d'expertise en analyse environnemental du Québec. 2003. Détermination de la spéciation de l'antimoine : méthode par chromatographe liquide à haute pression couplé à un spectromètre de masse à source ionisante au plasma d'argon. MA. 200 – Sb 1.1, Ministère de l'Environnement du Québec, 14.

Références bibliographiques

Chakraborty S., Mukherjee A., Das T.K. 2013. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus* : An implication of bioremediation of lead from liquid media. International Biodeterioration & Biodegradation, 84: 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.031>

Chakraborty S., Mukherjee A., Khuda-Bukhsh A.R., Das T.K. 2014. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus* : Its possible role in cadmium bioremediation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 106: 46- 53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.007>

Chance B., Maehly A.C. 1955. The assay of catalases and peroxidases. Methods of Biochemical Analysis, 1:357-424. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>

Chandra R., Dubey N.K., Kumar V. 2020. Phytoremediation of Environmental Pollutants (1rd edition). CRC Press, 524.

Chandrakar V., Dubey A., Keshavkant S. 2016. Modulation of antioxidant enzymes by salicylic acid in arsenic exposed Glycine max L. Journal of soil science and plant nutrition, 16(3): 662-676. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000048>

Charissou A.M., Cossu-Leguille C., Vasseur P. 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7, 8-dihydro-2'- deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. The Science of the Total Environment, 322(1-3): 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.09.028>

Chen C., Wang J. 2007.Influence of metal ionic characteristics on their biosorption capacity by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology Biotechnology, 74(4): 911- 917. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0739-1>

Cherit, H et Belhi, I. (2014). Identification des bactéries endophytes résistantes au Plomb et au Cadmium isolées des racines de deux plantes steppiques: *Lygeum epartum* et *Hedysarum pallidum*. Mémoire de fin d'étude: Biotechnologie des Mycètes, fermentation et production de substances fongiques. Constantine: Université Constantine 1,69.

Chowdhary P., Raj A., Verma D., Akhter Y. 2020. Microorganisms for Sustainable Environment and Health (1 ed). Elsevier Science, 534.

Clemente R. 2013. Antimony. In: Alloway, B.J (ed). Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability (3 ed). Netherlands: Springer, 497- 506.

Corticeiro S.C., Lima A.I.G., Figueira E.M.de A.P. 2006. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(1): 132-137.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.053>

Cristani M., Naccari C., Nostro A., Pizzimenti A., Trombetta D., Pizzimenti F. 2012. Possible use of *Serratia marcescens* in toxic metal biosorption (removal). *Environmental Science and Pollution Research International*, 19(1): 161-168. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0539-8>

<https://doi.org/10.1007/s11356-011-0539-8>

Das S. 2014. *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (1 ed). Elsevier, 643.

Davranche L., Haluwyn C.V., Cuny D. 2010. Approche du risque sanitaire lié à la consommation de champignons contaminés par les éléments traces métalliques, *BDSP*, 77 : 21-28.

David M., Krishna P. M., Sangeetha J. 2016. Elucidation of impact of heavy metal pollution on soil bacterial growth and extracellular polymeric substances flexibility. *3 Biotech*, 6(2) : 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0475-x>

Davranche L., Haluwyn C.V., Cuny D. 2010. Approche du risque sanitaire lié à la consommation de champignons contaminés par les éléments traces métalliques, *BDSP*, 77,21-28.

Deng Z., Cao L., Huang H., Jiang X., Wang W., Shi Y., Zhang R. 2011. Characterization of Cd and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in metal-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3): 717-724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078>

Deshmukh R., Tripathi D.K., Guerriero G. 2020. *Metalloids in Plants : Advances and Future Prospects*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 520.

Desmier T. 2016. *Les antioxydants de nos jours : Définition et applications*. Thèse de Doctorat: Faculté de Pharmacie. Université de Limoges, 88.

Deuneux-Mustin S., debet S.R., Mustin C., Henner P., Munier-lamy C., Claude C., Berthelin J. 2003. *Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : Influence des micro-organismes du sol*. Tec & Doc Lavoisier, 280.

Références bibliographiques

Devi K.A., Pandey P., Sharma G.D. 2016. Plant Growth-Promoting Endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 Enhances the Growth of *Achyranthes aspera* L., a Medicinal Plant. HAYATI Journal of Biosciences, 23(4): 173-180p. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.006>

Do Nascimento C.W.A., Xing B. 2006. Phytoextraction : A Review on Enhanced Metal Availability and Plant Accumulation. Scientia Agricola, 63(3): 299-311. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000300014>

El-Esawi M.A., Elkelish A., Soliman M., Elansary H.O., Zaid A., Wani S.H. 2020. *Serratia marcescens* BM1 Enhances Cadmium Stress Tolerance and Phytoremediation Potential of Soybean Through Modulation of Osmolytes, Leaf Gas Exchange, Antioxidant Machinery, and Stress-Responsive Genes Expression. Antioxidants, 9(1): 43. <https://doi.org/10.3390/antiox9010043>

Ewuzie U., Nnorom I., Eze S. 2020. Lithium in drinking water sources in rural and urban communities in Southeastern Nigeria. Chemosphere, 245(4): 125-593. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125593>

Ezzouhri L., Castro E., Moya M., Espinola F., Lairini K. 2009. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African Journal of Microbiology Research, 3(2): 35-48. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000354>

Fadhela M.M. 2017. Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de Doctorat: Phytopathologie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach.

Favier A. 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Undefined, 108- 115.

Ferret C. 2012. Rôle des *Pseudomonas fluorescents* dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de doctorant : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Strasbourg: Université de Strasbourg, 333.

Gadd G.M. 2001. Fungi in Bioremediation (1 ed). New York: Cambridge University Press : British Mycological Society, 497.

Gadd G.M. 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma, 122(2-1), 109-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.002>

Garait B. 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisolin®. Thèse de doctorat : Biologie cellulaire. Grenoble: Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 195.

Gauron C., Meda F., Dupont E., Albadri S., Quenech'Du N., Ipendey E., Volovitch M., Bene F.D., Joliot A., Rampon C., Vríz S. 2016. Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Developmental Biology*, 414(2): 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.004>

Gautier M., Normand A.C., L'Ollivier C., Cassagne C., Reynaud-Gaubert M., Dubus J.C., Brégeon F., Hendrickx M., Gomez C., Ranque S., Piarroux R. 2016. *Aspergillus tubingensis* : A major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. *Medical Mycology*, 54(5): 459-470. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv118>

Ge W., Zamri D., Mineyama H., Valix M. 2011. Bioaccumulation of heavy metals on adapted *Aspergillus foetidus*. *Adsorption*, 17(5): 901. <https://doi.org/10.1007/s10450-011-9359-x>

Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases : The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40(8): 959-975. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00019-3)

Gill S.S., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Giri A.V., Anandkumar N., Muthukumaran G., Pennathur G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4(1): 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>

Gnanamanickam S.S. 2007. *Plant-Associated Bacteria* (1 ed). Springer, 716.

Habi S. 2009. Etude de la métallo-résistance et de l'halo-tolérance des entérobactéries isolées des eaux de surface de la région de Sétif. Thèse de doctorat : Microbiologie. Sétif : Université Ferhat Abbas – Sétif, 1482.

Halušková L., Valentovičová K., Huttová J., Mistrík I., Tamás L. 2009. Effect of heavy metals on root growth and peroxidase activity in barley root tip. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(1): 59-65. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-009-0377-1>

Références bibliographiques

Haouchine T., Leham k. 2016. Isolement de bactéries résistantes aux métaux lourds et évaluation de leur activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes pathogènes. Mémoire de fin d'étude : Microbiologie Appliquée. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 103.

Hasanuzzaman M. 2021. Approaches to the Remediation of Inorganic Pollutants (1 ed). Springer, 676.

Haton C. 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la formation de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat: Physiologie et physiopathologie. Paris: université paris VI, pierre et marie curie, 167.

Hocine F.M., Gorine M. 2017. Évaluation de l'exposition au Plomb et Cadmium et impact sur quelques paramètres du statut oxydant/anti oxydant chez les ouvriers exposés aux fumées de soudage. Mémoire de fin d'étude: Toxicologie Industrielle et Environnementale. Tlemcen: Université Abou bekr belkaid-tlemcen, 50.

Horn B.W., Olarte R.A., Peterson S.W., Carbone I. 2013. Sexual reproduction in *Aspergillus tubingensis* from section Nigri. *Mycologia*, 105(5): 1153-1163.
<http://dx.doi.org/10.3852/13-101>

Huang H.B., Feng X.J., Liu L., Bin C., Lu Y.J., Ma L, She Z.G., Lin Y.C. 2010. Three Dimeric Naphtho- γ -Pyrones from the Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus tubingensis* Isolated from *Pongamia pinnata*. *Planta Medica* 76(16): 1888-1891.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1249955>

Huynh T.M.D. 2009. Impact des métaux lourds sur les interactions plante/ ver de terre/ microflore tellurique .Thèse de doctorat: Ecologie microbienne. Paris: Université Paris Est, 151.

Hyde K.D., Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers.* 33: 163-173.

Ibrahim K.K., Syed M., Shukor M., Ahmad S. 2014. Effect of Heavy Metals on Cyanide Biodegradation by Resting Cells of *Serratia marcescens* strain AQ 07. 2(2): 58-60.

Jacob C. 2001. Etude des interactions entre métaux lourds et champignons ectomycorhiziens: mise en évidence de gènes impliqués dans la réponse au Cadmium de *Paxillus involutus*. Thèse de Doctorat : Biologie Forestière. Nancy : Université Henri Poincaré, Nancy I, 194.

Kabata-Pendias A., Pendias H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants (3rd ed). Boca Raton London New York Washington, D.C : CRC Press, 403.

Karouche. 2017. Profil épidémiologique et balance pro / antioxydants de la surcharge pondérale chez les adultes de la localité d'Ain—Fakrnoun. Thèse de Doctorat: Biologie et Santé. Constantine: Université Constantine 1,136.

Kassa-Laouar M., Mechakra A., Rodrigue A., Meghnous O., Bentellis A., Rached O. 2020. Antioxidative Enzyme Responses to Antimony Stress of *Serratia marcescens* – an Endophytic Bacteria of *Hedysarum pallidum* Roots. Polish Journal of Environmental studies, 29(1): 141-152. <https://doi.org/10.15244/pjoes/100494>

Kayalto B. 2009. Contribution à l'évaluation de la contamination par les métaux lourds, de trois espèces de poissons, des sédiments et des eaux du lac Tchad. Mémoire d'études approfondies (DEA) : sciences alimentaires/nutrition. Cameroun : ENSAI-Université de Ngaoundéré.

Khalid A., Jin H. 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. African Journal of Microbiology Research, 7: 2288-2296. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1764>

Khan S., Nadir S., Shah Z.U., Shah A.A., Karunarathna S.C., Xu J., Khan A., Munir S., Hasan F. 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. Environmental Pollution, 225: 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>

Khanna A., Khanna M., Aggarwal A. 2013. *Serratia Marcescens*- A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit its Spread in Hospitalized Patients. Journal of Clinical and Diagnostic Research : Journal of Clinical and Diagnostic Research, 7(2): 243-246. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/5010.2737>

Références bibliographiques

Kornobis-Chérot N. 2012. Évaluation méthodologique et clinique des marqueurs de l'atteinte pulmonaire dans l'air exhalé : Comparaison de sujets présentant une pathologie respiratoire chronique et sujets témoins. Thèse de Doctorat: Médecine. France: Université LILE NORD DE France, 126.

Kotoky R., Nath S., Kumar Maheshwari D., Pandey P. 2019. Cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* S2I7 associated with the growth promotion of rice plant. *Environmental Sustainability*, 2(2): 135-144. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00055-3>

Kredics L., Varga J., Kocsubé S., Rajaraman R., Raghavan A., Dóczy I., Madhavan B., Németh T., Antal Z., Venkatapathy N., Vágvölgyi C., Samson R., Chockaiya M., Palanisamy M. 2009. Infectious Keratitis Caused by *Aspergillus tubingensis*. *Cornea*, 28(8): 951-954. <http://doi.org/10.1097/ico.0b013e3181967098>

Kumar A., Radhakrishnan E.K. 2020. *Microbial Endophytes : Functional Biology and Applications* (1 ed). Elsevier Science, 418.

Kumar V., Saxena G. 2020. *Microbe-Assisted Phytoremediation of Environmental Pollutants : Recent Advances and Challenges* (1 ed). Boca Raton: A K Peters/CRC Press, 217.

Landrigan P.J., Fuller R., Acosta N.J.R., Adeyi O., Arnold R., Basu N., et al., 2017. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet*, 391(10119): 462-512. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32345-0)

Li Q., McNeil B., Harvey L.M. 2008. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* BI-D. *Free Radical Biology & Medicine*, 44(3): 394-402. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.019>

Lilia L.D.L., Isaura C., Julie B., Elodie C., Jose R., Patricia T., Florence M. 2019. Influence of Culture Conditions on Production of NGPs by *Aspergillus tubingensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9): 1412-1423. <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05015>

Limmer M., Burken J. 2016. Phytovolatilization of Organic Contaminants, *Environmental Science & Technology*, 50(13) : 6632-6643. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04113>

Références bibliographiques

Louaar S., Maatoug S. 2016. Etude du stress oxydatif chez une bactérie résistante à l'antimoine. Mémoire de fin d'étude : Biochimie /Analyse protéomique et santé. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine, 48.

Ma Y., Li T., Ma C.C. 2015. A new pyrone derivative from an endophytic *Aspergillus tubingensis* of *Lycium ruthenicum*. *Natural Product Research*. 30(13): 1499-503. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1114939>

Malayeri B.E. 1995. Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes. Thèses de Doctorat : Biologie des organismes. Nancy : Université Henri Poincaré-Nancy1, 99.

Marcos A., Luna C., Rodrigues E., Vieira E.R., Okada K., Campos-Takaki., Do Nascimento A.E. 2015. Copper-induced adaptation, oxidative stress and its tolerance in *Aspergillus niger* UCP1261. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2): 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.006>

Marklund S., Marklund G. 1974 . Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 7(3):469-74. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

Martin S., Griswold W. 2009. Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs from Citizens*, 15, 1-6.

Meghnous O. 2020. Etude de l'aptitude des souches fongiques, isolées de la rhizosphère de deux plantes steppiques de la région minière d'Ain-Babouche, à la remédiation des sols métallifères. Thèse de Doctorat : Biotechnologie et bioprocédés, Application Mycologique. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine, 147.

Meghnous O., Dehimat L., Doumas P., Kassa-Laouar M., Mosbah F., Rached O. 2019. Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf. *Biologia*, 74(12) : 1711-1720.

Meghnous O., Meghraoui A .2011. Identification des souches fongique isolées de la rhizosphère d'*Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum* poussant sur des déblais de mine d'antimoine de la région d'Ain-Babouche. Impact de l'antimoine ou du chrome sur la croissance fongique. Mémoire de fin d'étude : biotechnologie des mycète : fermentation et production de substance fongique : Constantine : Université Frères Mentouri Constantine

Melila M., Poutouli W., Amouzou K.S., Tchangbedji G., Tchaou M., Doh A., Goto C. 2012. Induction du stress oxydatif chez l'homme suite à la bioconcentration des éléments traces métalliques (cadmium et plomb) par voie trophique à Kpémé (Sud du Togo). International Journal of Biological and Chemical Sciences, 6(3): 1263-1270. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v6i3.29>

Michel A. 2009. Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. Thèse de doctorat : Biochimie [q- bio.BM]. Brest : Université de Bretagne occidentale-Brest, 135.

Moricca S., Ragazzi A. 2008. Fungal Endophytes in Mediterranean Oak Forests : A Lesson from *Discula quercina*. *Phytopathology*®, 98(4): 380-386. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-4-0380>

Mubarak H., Chai L.Y., Mirza N., Yang Z.H., Pervez A., Tariq M., Shaheen S., Mahmood Q. 2015. Antimony (Sb) - pollution and removal techniques –critical assessment of technologies. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97(10): 1296-1318. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1095549>

Mukherjee A., Das D., Mondal S.K., Biswas R., Das T.K., Boujedaini N., Khuda-Bukhsh A.R. 2010. Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(2): 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.015>

Muralikrishna I.V., Manickam V. 2017. Analytical Methods for Monitoring Environmental Pollution. In: Muralikrishna, I. V and Manickam (Éds.), *Environmental Management: Science and Engineering for Industry* (1st ed). Butterworth-Heinemann, 495-570.

Références bibliographiques

Nadumane V.K., Venkatachalam P., Gajaraj B. 2016. *Aspergillus* Applications in Cancer Research. In: Gupta, V.K. (ed.). New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering , Elsevier, 243-255.

Naquet A., Hanriot M. 1890. Principes de chimie Fondée sur les théories modernes: Chimie minérale. Chimie organique (2 volumes). Paris: Librairie F. Savy.

Neijssel O.M., Buurman E.T., Joost Teixeira de Mattos M. 1990. The role of futile cycles in the energetics of bacterial growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1018(23) : 252–255. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90260-b](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90260-b)

Nouri M., Haddioui A. 2016. Les techniques de dépollution des sols contaminés par les métaux lourds : Une revue (The remediation techniques of heavy metals contaminated soils: a review), *Maghrebien Journal of Pure and Applied Science*, 2(2) : 47-58. <https://doi.org/10.48383/IMIST.PRSM/mjpas-v2i2.7829>

OECD .1996. Declaration on risk reduction for lead. Adopted at the Meeting of Environment Ministers, February 20,

Ouattara A. 2008. Lixiviation Fongique des Résidus miniers par *A. Niger* et *P. Simplicissimum*. Thèse de Doctorat : génie civil. Laval : Université Laval Québec, 273.

Polidoros A.N., Scandalios J.G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*. 106: 112-120.

Prasad M. N., Strzalka K. 2002. Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Springer Netherlands, 433.

Pulford I.D., Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—A review. *Environment International*, 29(4): 529-540. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00152-6](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00152-6)

Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3): 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>

Redon P. 2009. Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*). Thèse de Doctorat : Sciences du Sol. Nancy : Université Henri Poincaré, Nancy I, 198.

Rejeb K.B., Chedly A., Savoure A. 2012. La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biologie Aujourd'hui*, 206(4) : 291-299. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012030>

Repussard C., Zbib N., Tardieu D., GUERRE P. 2013. Les champignons endophytes du genre *Neotyphodium* et leurs toxines : Généralités et problématique française. 12(164): 583-606.

Saliba S. 2015. Nouvelles approches biotechnologiques pour l'obtention d'alcaloïdes : Culture in vitro de *Leucojum aestivum* L. et isolement d'endophytes bactériens d'*Amaryllidaceae*, Thèse de doctorat: Phytochimie. Lorraine: Université de Lorraine, 235.

Schützendübel A., Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses : Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1351>

Selvakumar G., Mohan M., Kundu S., Gupta A.D., Joshi P., Nazim S., Gupta H.S. 2008. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in Applied Microbiology*, 46(2): 171-175. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02282.x>

Sénéquier-Crozet A., Canard B. 2016. Les champignons endophytes : Impact sur les écosystèmes et production de molécules d'intérêt thérapeutique. Thèse de Doctorat: Pharmacie. Université Grenoble Alpes, 104.

Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative. Defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Sieber T.N. 2002. Fungal root endophytes. In: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds). *Plant Roots: The Hidden Half* (3 ed). New York: Marcel Dekker Inc, 887-917.

Références bibliographiques

Silva D.M., Batista L.R., Rezende E.F., Fungaro M.H. P., Sartori D., Alves E. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology], 42(2): 761-773. <https://doi.org/10.1590/s1517-838220110002000044>

Singh H. 2006. *Mycoremediation : Fungal Bioremediation* (1 ed). Hoboken: Wiley-Blackwell, 592.

Singh M., Srivastava P.K., Verma P.C., Kharwar R.N., Singh N., Tripathi R.D. (2015). Soil fungi for mycoremediation of arsenic pollution in agriculture soils. *Journal Applied Microbiology*. 119(5): 1278-1290. <https://doi.org/10.1111/jam.12948>

Singh S.N., Tripathi R.D. 2007. *Environmental Bioremediation Technologies* (1 ed). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 527.

Siripornadulsil S., Traina S., Verma D.P.S., Sayre R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell Online*, 14(11); 2837-2847. <https://doi.org/10.1105/tpc.004853>

Smine S. 2017. *Obésité induite par un régime riche en lipides (HFD) et effet protecteur d'un extrait polyphénolique de raisin (GSSE) : Approche protéomique*. Thèse de Doctorat: Biologie moléculaire et cellulaire. Tunis: Université de Rouen Normandie, 200.

Soufane S., Mekkiou N. 2018. *Evaluation des paramètres du stress oxydatif chez une bactérie capable de biodégrader le diclofénac*. Mémoire de fin d'étude: Biochimie. Jijel: Université Mohammed- Seddik Benyahia- Jijel.

Staniek A., Woerdenbag H.J., Kayser O. 2008. Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *Journal of Plant Interactions*, 3(2): 75-93. <https://doi.org/10.1080/17429140801886293>

Sterflinger K. 2000. Fungi as Geologic Agents. *Geomicrobiology Journal*, 17(2): 97-124. <https://doi.org/10.1080/01490450050023791>

Stern C. 2008. *Environnement & Ecologie*. Arles : Actes Sud. 302.

Références bibliographiques

Tella M. 2009. Impact de la matière organique sur le transport de l'antimoine dans les eaux naturelles : Étude expérimentale et modélisation physico-chimique. Thèse de doctorat : Géochimie. Toulouse : Université Toulouse III - Paul Sabatier, 236.

Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Panasiuk T., Tipping C. 2019. Effect of selected heavy metal ions on the growth of entomopathogenic fungi from the genus *Isaria*. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(2): 2571-2582. https://doi.org/10.15666/aer/1702_25712582

Tsekova K., Dentchev D., Todorova D. 2000. Effect of cadmium and copper on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 45(4): 331-334. <https://doi.org/10.1007/BF02817556>

Todorova D., Nedeva D., Abrashev R., Tsekova K. 2008. Cd (II) stress response during the growth of *Aspergillus niger* B 77. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1): 178-184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03538.x>

Tsekova K., Dentchev D., Todorova D. 2000. Effect of cadmium and copper on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 45(4): 331-334. <https://doi.org/10.1007/BF02817556>

Ullah I., Al-Johny B.O., Al-Ghamdi K.M.S., Al-Zahrani H.A.A., Anwar Y., Firoz A., Al-Kenani N., Almatry M.A.A. 2019. Endophytic bacteria isolated from *Solanum nigrum* L., alleviate cadmium (Cd) stress response by their antioxidant potentials, including SOD synthesis by *sod A* gene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15(174): 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.074>

Valix M., Tang J.Y., Malik R. 2001. Heavy metal tolerance of fungi, presented at minerals engineering, 14(5): 499-505. [https://doi.org/10.1016/S08926875\(01\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S08926875(01)00037-1)

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro- antioxidants network : An overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14): 1677-1694. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>

Références bibliographiques

- Vidali M. 2001.** Bioremediation. An overview*, Pure and Applied Chemistry, 73(7): 1163-1172. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Wang Q., Ge C., Xu S., Wu Y., Sahito Z.A., Ma L., Pan F., Zhou Q., Huang L., Feng Y., Yang X. 2020.** The endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR12 alleviates Cd stress in oilseed rape through regulation of the GSH-AsA cycle and antioxidative enzymes. BMC Plant Biology, 20(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12870020-2273-1>
- Wang Q., He M., Wang Y. 2010.** Influence of combined pollution of antimony and arsenic on culturable soil microbial populations and enzyme activities. Ecotoxicology. 20(1): 9–19. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0551-7>
- You Y.H., Park J.M., Lim S.H., Kang S.M., Park J.H., Lee I.J., Kim J.G. 2016.** Gibberellin A7 production by *Aspergillus tubingensis* YH103 and cultural characteristics of endophytic fungi isolated from *Tetragonia tetragonoides* in Dokdo islands. Korean J Microbiol. 52(1) : 32-39. <http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2016.5071>
- Zerroug A. 2018.** Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *retama raetam* Forssk. Mémoire de fin d'étude: Microbiologie. Setif: Université ferhat abbas-setif, 77.

Annexes



Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf.

Ouissem Meghnous¹ · Laid Dehimat² · Patrick Dumas³ · Mounia Kassa-Laouar¹ · Fawzia Mosbah¹ · Oualida Rached⁴

Received: 5 January 2019 / Accepted: 10 July 2019
© Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences 2019

Abstract

Antimony (Sb) is a toxic metalloid whose pollution has become a serious problem. However, studies on fungal endophytes resistant to antimony are virtually nonexistent. An endophytic fungal strain was isolated for the first time from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf. which is a Sb accumulator *Fabacea* growing on mine cuttings. Experiments with high Sb increased concentrations (0, 5, 10, 20 and 30 mM Sb) were performed in order to assess the strain potential in contaminated environments bioremediation and to understand its Sb tolerance strategy. The isolated strain was identified as *Aspergillus tubingensis* MH189391 by morphological characteristics and phylogenetic analysis. It exhibited a minimum inhibitory concentration (MIC) of 500 mM Sb, i.e. 60,880 mg L⁻¹, and maintained high amounts of biomass up to 30 mM Sb, i.e. 3652.8 mg L⁻¹ of Sb. A stimulation of *A. tubingensis* growth and its antioxidant responses was observed at the level of 5 mM Sb, i.e. 609 mg L⁻¹. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) contents increased significantly ($p < 0.05$) with Sb treatments. Oxidative stress induced significant increases ($p < 0.05$) in antioxidant biomarkers such as proline, catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD), but it resulted in a significant decrease of peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) activities. Proline, CAT, SOD, H₂O₂ and MDA were significantly ($p < 0.05$) and positively correlated, which highlights their coactions in oxidative stress fighting. Results indicate that *Aspergillus tubingensis* has developed an important adaptation to excessive Sb concentrations and that it could be used in antimony-contaminated environments bioremediation.

Keywords Metalloid · Antioxidants · Endophyte · Fungus · Mine cuttings

Abbreviations

APX Ascorbate peroxidase
CAT Catalase
MDA Malondialdehyde
MIC Minimum inhibitory concentration

p Probability value
PCR Polymerase chain reaction
POD Peroxidase
r Correlation coefficient
ROS Reactive oxygen species
SEM Standard error of the mean
Sb Antimony
SOD Superoxide dismutase

✉ Oualida Rached
o.rached@ensbiotech.edu.dz; oualida.rached@hotmail.fr

¹ Biology and Environment Laboratory, Faculty of Nature and Life Sciences, Mentouri University, Constantine 1, Constantine, Algeria

² Mycology, Biotechnology and Microbial Activity Laboratory, Mentouri University, Constantine 1, Constantine, Algeria

³ BPMP, CNRS, INRA, Montpellier SupAgro, University of Montpellier, Montpellier, France

⁴ Biotechnology High National School Taoufik Khaznadar, Ali Mendjeli University City, B.P. E66, 25100 Constantine, Algeria

Introduction

Antimony (Sb) is a toxic metalloid existing in trace amounts in uncontaminated soils where it ranges in average from 0.3 mg kg⁻¹ to 8.4 mg kg⁻¹ (Clemente 2013). Sb was considered as a priority Pollutant by the United States Environmental Protection Agency (Zhou et al. 2018). A few decades ago, Sb pollution was relatively localized and concerned mining areas

and the surroundings of some industries mainly. But in the last 30 years, this metalloid has become a widespread pollutant. In fact, according to Mubarak et al. (2015), soil contamination by antimony due to human activities has considerably increased in the recent past. Sb uses by man are numerous and very diverse. The main use of Sb is as a hardener for lead in lead-acid batteries, cable sheaths and ammunition and as an important component in semiconductors. Large amounts of Sb (such as antimony trioxide Sb_2O_3) are used as flame retardants in textiles, paper, plastics and adhesives without any prospects for the development of alternative materials. Sb is also used in ceramics as an opacifier, in paints as a mordant, in brake linings, in pest control agents, in polyethylene terephthalate (PET) plastics and as an additive in the tire vulcanization process (Clemente 2013; Pierart et al. 2015).

Antimony pollution increase may constitute a serious threat to human health and to other living organisms. The development of Sb removal biotechnologies of contaminated sites is therefore necessary. Bioremediation, in situ treatment, provides a safe and economic alternative to the physicochemical strategies commonly used (Ma et al. 2016). Metal accumulating plants harbor in their roots microorganisms, known as endophytes, with potential to accumulate metals from polluted environment and to enhance metal uptake by plants (Ma et al. 2016). Thus, such endophytes, or both endophytes and their hosts, could be used in metalloid polluted environments bioremediation. In the host-endophytic association, host tolerance to abiotic stress is enhanced by an increase in antioxidant activity by the symbiont whose antioxidants production is also increased (Devi et al. 2017). Such an increase in antioxidants by the endophyte is a sign of its resistance to the pro-oxidants involved. Thus, the measurement of the antioxidants produced by an endophyte exposed to a metal stress would highlight its degree of resistance to the metal involved and therefore its possible use in the bioremediation of metal contaminated environments. However, the antioxidant system role in fungi resistance towards this metalloid remains virtually nonexistent.

In the Djebel Hamimat area (southeast of Constantine, Algeria) an abandoned mining exploitation has generated important quantities of soils containing various toxic metals, mainly antimony whose concentration reached $81.446 \text{ mg kg}^{-1}$ (Benhamdi et al. 2014). In this area, a chemical analysis of a metallophyte, *Hedysarum pallidum* Desf., carried out by the authors in question highlighted up to 263 mg kg^{-1} of Sb in its aerial parts and 183 mg kg^{-1} in its underground parts. The above authors showed that this species exhibited significant antioxidant enzymatic activities in its two parts to fight oxidative stress generated by metallic pollution. Thus, it is possible that this plant harbors endophytic fungi in its roots that would help it to tolerate high levels of this metalloid in its tissues. Such endophytes could be resistant to antimony high levels and present a powerful antioxidant

defense system that make them potential candidates for bioremediation of antimony-contaminated environments.

The purpose of the present work is to highlight and identify the most antimony tolerant endophytic fungus from *H. pallidum* roots by determining its MIC. The goal is also to determine the strain tolerance strategy to Sb by studying the metalloid impact on the antioxidant biomolecules induction. Results would determine the strain's ability to bioremediation of contaminated environments by this metalloid.

Materials and methods

Site characteristics and plant sampling

The study area is located 90 km away from Constantine, more precisely in the province of Oum El Bouaghi, a semiarid region in the northeast of Algeria with the following geographical coordinates: $35^{\circ}58'37.64'' \text{ N } -7^{\circ}11'22.80'' \text{ E}$ to $36^{\circ}01'09.78'' \text{ N } -7^{\circ}14'38.38'' \text{ E}$ (Benhamdi et al. 2014). In this area, an old abandoned antimony surface mine is situated on the side of a mountain (Djebel Hamimat) with an average altitude of 865 m (Bentellis et al. 2014).

Soils and plant roots were taken from the most contaminated spoil of the study area. The soils showed the following physicochemical characteristics: $62,000 \text{ mg kg}^{-1} \pm 4,924 \text{ Sb}$, $2,300 \text{ mg kg}^{-1} \pm 186 \text{ As}$, $0.9 \pm 0.04\% \text{ Organic matter (OM)}$, $\text{pH } 8.01 \pm 0.09$, $7.8 \pm 1.82\% \text{ CaCO}_3$, $23.0 \pm 4.9\% \text{ Clay}$, $16.3 \pm 1.02\% \text{ Silt}$, $53.7 \pm 3.22\% \text{ Sand}$ (Benhamdi et al. 2014).

Eight specimens of *H. pallidum* were randomly chosen from the analyzed spoil. The roots of each specimen were extracted with sterile auger, taken with sterile gloves and put in sterile flasks after being separated from the aerial part by sterile scissors.

Isolation and selection of endophytes resistant to antimony

In order to isolate fungal endophytes, *H. pallidum* roots were washed with sterile water to remove soil particles, then immersed successively in 75% (v:v) ethanol solution for 2 min and in sodium hypochlorite (35° Chlorine) at 5% for 1 min, finally, washed in sterile water three times to remove the surface sterilization agents. After the last rinse and to check the effectiveness of the disinfection, 0.3 mL of the final rinse water were inoculated into the potato dextrose agar (PDA) medium supplemented with gentamicin and incubated at 30 °C. The absence of any fungal growth on this medium indicated that all the fungi that have been isolated are endophytes (Deng et al. 2011). After that, the washed roots were cut into small pieces, placed on PDA medium and incubated at 30 °C for 1 to 2 weeks. After incubation, the obtained strains were transplanted several times on PDA

medium in order to be purified. The purified strains were stored at 4 °C (Deng et al. 2011).

To screen the antimony resistant fungal endophytes, the obtained isolates were grown on Sabouraud agar containing per liter of medium: 10 g peptone, 20 g glucose, 20 g agar, and increasing amounts of antimony in the form of tartrate ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ from Sigma-Aldrich). The pH of the medium was maintained at 6.4 before autoclaving (Mukherjee et al. 2010). The selection cultures were incubated at 30 °C for 96 h. The fungal growth was monitored daily by reference to the control (Sabouraud agar culture without addition of metal). The lowest concentration of the metalloid, which completely inhibits the growth of the isolates, was considered as the minimal inhibitory concentration (MIC).

Resistant strain identification

The resistant isolate was identified by the cultural, morphological characteristics and analysis of the sequences of the calmodulin gene, TUB1/TUB2 (5 'TCGACAGCTATTTC CCCCTT 3') / (5 'TAGCATGTCATATCACGGGCAT 3') by PCR amplification of specific primers.

The sequences obtained after sequencing at Eurofins/ Genomics Laboratory (Germany) were subjected to a sequence homology search using the BLAST program at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to search for the closest sequences deposited in Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). For this purpose, the sequences of the calmodulin gene were aligned with the sequences of the similar fungi retrieved from the databases using CLUSTAL X, and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method (MEGA version 7).

Preparation of fungal biomass for the determination of Sb toxicity biomarkers

The biomass of the resistant strain was obtained from submerged cultures in the modified Sabouraud broth, composed of 50 mM citrate buffer (pH 6.4): 10 g peptone and 20 g glucose, per liter.

The total volume, 50 mL of buffered Sabouraud broth, was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks. The broth medium was inoculated with spores of the resistant strain and then incubated at 30 °C for 96 h in a rotary incubator at 175 rpm (New Brunswick Scientific, Co., Inc., NJ, USA).

For the biomarkers determination, four media were prepared, aseptically and separately, by supplementing Sabouraud broth with Sb increasing amounts (5, 10, 20 and 30 mM) in tartrate form. A control medium was prepared with buffered Sabouraud broth without any Sb additions. The maximum dose was determined by the minimum amount of biomass necessary to perform the biomarker toxicity analysis. The biomass was recovered after a 96 h incubation, after

filtration and rinsing with sterile bi-distilled water. It was then stored at -20 °C until use (Mukherjee et al. 2010).

The pH variations before inoculation and after obtaining the biomass were stabilized by the addition of citrate buffer to the culture media according to the method of Chakraborty et al. (2014).

Intracellular H_2O_2 assay

The intracellular H_2O_2 content was measured according to the method described by Chakraborty et al. (2014). The fresh mycelia (0.5 g) were homogenized in an ice bath with 5 mL of 0.1% TCA (w:v). The homogenate was centrifuged at 12000×g for 15 min, then 0.5 mL of the supernatant was added to 10 mL of the phosphate buffer (0.5 mM, pH 7.0) and 1 mL of the 1 M KI. The absorbance was read at 390 nm. The H_2O_2 contents were determined from a standard curve.

Malondialdehyde (MDA) assay

The MDA was assayed following the method used by Benhamdi et al. (2014) in order to evaluate the level of lipid peroxidation. Fresh biomass (0.5 g) was crushed in liquid nitrogen and homogenized with a 5 mL solution containing 20% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was incubated at 95 °C for 30 min and the reaction was stopped by immersing the tubes in ice. The cooled mixture was centrifuged at 5000×g for 10 min at 25 °C. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the absorbance at 532 nm and the MDA concentration was determined by its molar extinction coefficient: $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. It was expressed in $\mu\text{M g}^{-1}$ of fresh biomass.

Intracellular proline assay

The intracellular proline content was determined by the method adopted by Zhang et al. (2011). Fresh biomass (0.1 g) was ground in an ice bath. Then, 2 mL of 40% methanol (v:v) were added after incubation at 85 °C for 60 min and cooled to room temperature. After decantation, 1 mL of the supernatant was mixed with 2 mL of acetic acid, 25 mg ninhydrin and 1 mL of a mixture containing: acetic acid, distilled water and orthophosphoric acid (120:300:80; v:v:v). The mixture was boiled for 30 min and then placed in an ice bath to stop its reaction. In order to allow the phase separation, toluene was added to the mixture and stirred vigorously. The intensity of the red color of the upper phase was read at 528 nm. The concentration of proline was determined using the extinction coefficient $0.62 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ relative to the fresh weight.

Antioxidant enzyme activities assay

For antioxidant enzyme activities measures, the fresh biomass of the resistant fungal strain (0.5 g) was ground into a fine powder with a mortar in liquid nitrogen. The proteins were then extracted at 4 °C with 3 mL of cold potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) containing 0.1% triton X-100 (v:v) and 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) (w:v). The homogenate was centrifuged at 14000×g at 4 °C for 15 min and the supernatant was used to measure antioxidant activities (Mukherjee et al. 2010).

Protein concentrations were quantified according to Lowry et al. (1951) method, using BSA (*bovine serum albumin*) as a standard.

The activity of catalase (CAT) (EC.1.11.1.6) was measured according to the method of Chance and Maehly (1955). The decomposition of hydrogen peroxide was determined by its absorbance decrease at 240 nm ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The activity of CAT was expressed in $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins.

The total activity of SOD (EC.1.15.1.1) was evaluated according to the method of Marklund and Marklund (1974) by its ability to inhibit autoxidation of pyrogallol at 420 nm. The SOD unit was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of pyrogallol autoxidation.

The POD activity (EC.1.11.1.7) was quantified according to the method of Chance and Maehly (1955); the amount of purpurogallin formed between H_2O_2 and pyrogallol was measured at 420 nm and the enzymatic activity was expressed as $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins.

The activity of APX (EC.1.11.1.11) was measured according to the method of Nakano and Asada (1980) by decreasing in the absorbance of oxidized ascorbate in the presence of H_2O_2 at 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins.

Statistical analysis

The obtained data for the different tested biomarkers at increased Sb concentrations were presented in bar graphs and correspond to means (\pm SEM) of 3 repetitions. The significance of the differences between the means, at the level of $p < 0.05$, was estimated using a variance analysis (ANOVA) followed by the Tukey's test. The relationships between all analyzed variables and between those and Sb concentrations of the medium were tested by the Pearson correlation coefficients (r). The data treatment was carried out using XLStat software (XLStat 2014, Addinsoft, Paris, France).

Results

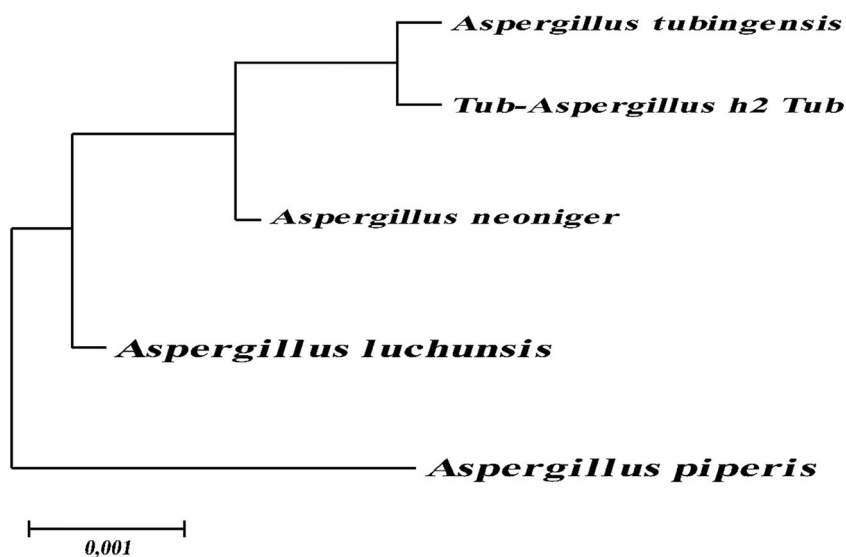
Antimony-resistant strain identification

Of the 36 endophytic strains isolated from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf., only the isolate Tub-H2 was able to grow up to 500 mM Sb. This strain showed a rapid growth at 28–30 °C by covering the agar without Sb with a white powder at the beginning of the growth which became black during the development. The mycelium has distinct septa and black brown spores. The morphological and cultural characteristics of this isolate allowed its affiliation to the genus *Aspergillus*.

The analysis of the calmodulin gene sequences indicated that the resistant strain Tub-H2 was affiliated to *Aspergillus tubingensis* with a 100% similarity (Fig. 1).

Thus, the morphological and phylogenetic characteristic identification makes it possible to conclude that the resistant strain is *Aspergillus tubingensis* MH189391.

Fig. 1 Phylogenetic tree according to distance method (Neighbor-Joining) based on the analysis of calmodulin gene sequences using Mega (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software showing the phylogenetic position of the Tub-H2 isolate



Antimony effect on fungal biomass

Biomass of *Aspergillus tubingensis*, represented by its dry weight (Fig. 2a), decreased significantly with the increase of Sb concentrations. It was very significantly and negatively correlated with the metalloid concentrations (Table 1). At 5 mM Sb, *A. tubingensis* biomass increased significantly by 25% compared to the control and was

significantly higher than the biomass obtained with all the Sb concentrations.

Intracellular H₂O₂ contents

The intracellular H₂O₂ contents of *A. tubingensis* (Fig. 2b) did not present significant increases at 5, 10 and 20 mM Sb, compared to the control. At 5 mM Sb, they were

Fig. 2 Dry weight and Biochemical responses measures, according to Sb concentrations, in the endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from roots of *Hedysarum pallidum* Desf. **a** dry weight, **b** H₂O₂ contents, **c** MDA contents, **d** Proline contents, **e** CAT activities, **f** SOD activities, **g** POD activities, **h** APX activities. Values represent means ± SEM (N = 3). Different letters discriminate statistical differences between the measured parameters at the different antimony (Sb) concentrations (using ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05)

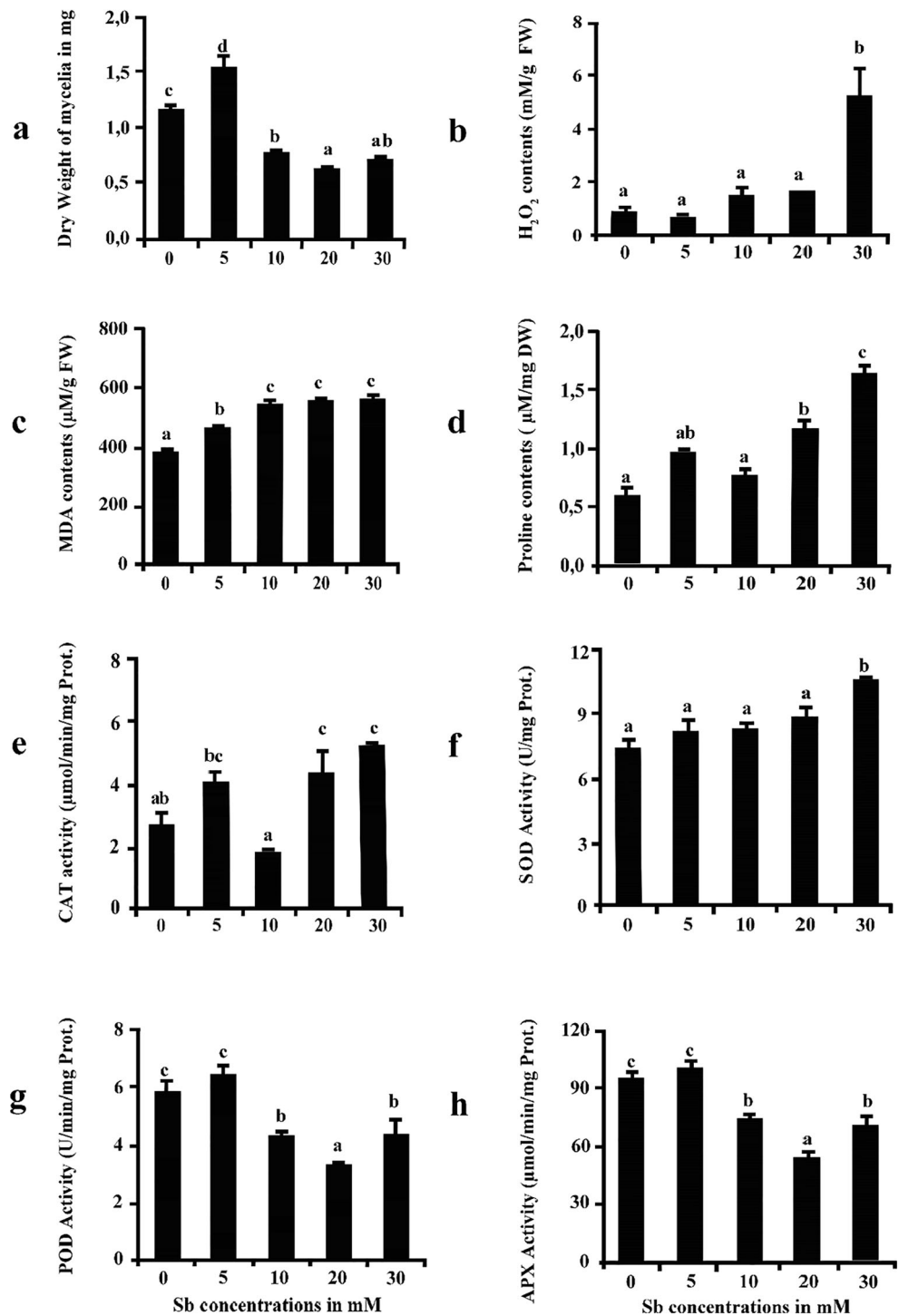


Table 1 Pearson correlation coefficients between all analyzed variables and between those and antimony culture medium concentrations

	Dry weight	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	SOD	POD	APX
Sb (mM)	-0,710**	0,868***	0,841***	0,934***	0,688**	0,919***	-0,656**	-0,745**
Dry weight	1	-0,535*	-0,706**	-0,436	-0,096	-0,498*	0,927***	0,911***
H ₂ O ₂		1	0,611*	0,858***	0,605*	0,883***	-0,424	-0,456
MDA			1	0,704**	0,372	0,711**	-0,712**	-0,800**
Proline				1	0,850***	0,711**	-0,395	-0,511*
CAT					1	0,755**	-0,152	-0,277
SOD						1	-0,451	-0,525*
POD							1	0,932***

* $p < 0.05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ ($n = 15$)

slightly lower than those of the control, whereas at 10 and 20 mM Sb they showed an increase of 174% and 197% respectively, compared to the control. At 30 mM Sb, the intracellular H₂O₂ contents were significantly higher than the control that they exceeded by 631%. They were very significantly and positively correlated with Sb concentrations in media but negatively and significantly with strain's dry weight (Table 1).

MDA contents

The MDA contents of *A. tubingensis* (Fig. 2c) increased significantly at 5 and 10 mM Sb compared to the control. At 5 mM Sb they exceeded those of the control only by 30%, whereas at 10 mM Sb they exceeded it by 44%. From 10 to 30 mM Sb, MDA contents of the strain remained significantly invariable. They showed positive and very significant correlation with media Sb concentrations, significant positive correlation with strain's H₂O₂, but significant negative correlation with the strain dry weight (Table 1).

Intracellular proline contents

The proline contents of *A. tubingensis* (Fig. 2d) increased significantly at 5 mM Sb. They were 69% higher than that of the control, and significantly closer to the contents obtained at 20 mM Sb level, while at 10 mM Sb, they decreased to be also closer to the control, remaining 28% higher.

The proline levels increased significantly at 20 and 30 mM Sb, exceeding those of the control by 97.50% and 177% respectively. In general, the appearance of the diagram showed a progressive increase in proline levels with increasing Sb, except at 5 mM Sb where a significant increase in proline contents was observed compared to 0 and 10 mM. Moreover, they were very significantly and positively correlated with media Sb concentrations strain's H₂O₂ and MDA contents, but

negatively correlated, although not significantly, with strain's dry weight (Table 1).

Antioxidant enzyme activities

Overall, it appears (Fig. 2e) that CAT activities increased progressively and significantly according to Sb concentrations in culture media except at 5 mM Sb. At this concentration, as for proline level, the CAT was significantly higher than that measured at 0 and 10 mM Sb and was close to activities measured at 20 and 30 mM Sb. These latter exceeded that of the control by 163% and 197% respectively. CAT activities showed positive and significant to very significant correlations with Sb concentrations, with strain's H₂O₂ and proline contents. They also showed positive correlation, although not significant, with MDA contents, and no correlation with strain's dry weight (Table 1).

SOD activities of *A. tubingensis* increased steadily, but not significantly, from 0 to 20 mM Sb (Fig. 2f). It was only at 30 mM Sb that the SOD presented an activity significantly higher than the control. However, SOD activities showed very significant positive correlations with Sb concentrations, H₂O₂, MDA, proline contents and CAT activities, but, significant negative correlations with strain's dry weight and APX activities. They also showed almost significant negative correlation with POD activities (Table 1).

The diagrams of POD and APX activities showed a very similar general aspect. They also had a important similarity to the biomass diagram. POD and APX activities (Fig. 2g and h) revealed a slight increase of 111% and 106% respectively at 5 mM Sb. Then they showed significant decrease from 10 mM Sb, compared to the control. However, the decrease at 30 mM of Sb (i.e. 3,653 mg L⁻¹) was respectively only 22% and 29% of that the control.

Both enzymes had very significant positive correlations between them and with strain's dry weight. They exhibited significant to almost significant negative correlations with

Sb concentrations, MDA, H₂O₂, proline contents, and SOD activities (Table 1).

Discussion

Aspergillus tubingensis, isolated for the first time from the roots of a steppic antimony accumulator plant *Hedysarum pallidum* Desf., growing on Sb mine spoils, proves to be a real endophyte, because it was also isolated from the roots of another species, *Pongamia pinnata*, by Huang et al. (2010), and from tissues of Mangrove trees by Bacal and Yu (2017).

Toxicity in vitro tests showed that *A. tubingensis* was tolerant at concentrations up to 500 mM Sb, namely 60,880 mg L⁻¹, which corresponds to the maximum level of Sb determined in the mining region (Benhamdi et al. 2014). Such a resistance level does not appear to be an exceptional character of this strain since Qayyum et al. (2016) already demonstrated its resistance to heavy metals.

The toxic effect of Sb on *A. tubingensis* was highlighted by the significant decrease of its biomass according to Sb concentrations increase. It was also evidenced by the very significant negative correlation of its biomass with Sb concentrations. The biomass decrease can be explained by the physiological mechanisms modification of tested strain in response to Sb toxicity. In fact, according to Chakraborty et al. (2012, 2014), non-lethal metallic amounts induce a disturbance in the membrane permeability of the fungal cell and consequently a significant loss of essential nutrients for fungal growth. However, *A. tubingensis* still preserved a significant biomass (61% of the control) at 30 mM Sb, namely 3,653 mg L⁻¹ Sb. Such a result shows an important resistance of this strain to Sb toxicity.

The significant increase in biomass at 5 mM Sb compared to the control (0 mM Sb), instead of its decrease, shows that the strain's growth was stimulated by the presence of Sb. The concentration of 5 mM, ie 609 mg L⁻¹, is relatively high since the normal levels of Sb in soils are inferior to 8 mg kg⁻¹ (Clemente 2013). It is also much higher than the maximum Sb content (183 mg kg⁻¹) determined in the roots of *H. pallidum* from which *A. tubingensis* was isolated (Benhamdi et al. 2014). Such a result suggests that the adaptation of this fungal strain to excessive Sb levels in the natural environment has resulted in this element becoming necessary for its development at a relatively high threshold concentration. Beyond this threshold, Sb becomes toxic for the strain by reducing its growth, but its toxicity remains low since the strain still had an important biomass.

The toxicity of antimony in the medium induced the formation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂). This was evidenced by the very significant positive correlation of Sb concentrations with H₂O₂ contents. However, it was only from 30 mM Sb that the production of H₂O₂ became important by being significantly higher than the

control. Indeed, H₂O₂ contents produced at the lowest concentrations (5, 10 and 20 mM Sb) were not significantly different from that of the control medium (0 mM Sb). As a result, the oxidative stress generated by antimony toxicity become significant only from 30 mM Sb, indicating an important resistance of the strain to concentrations below this level, but which are still very high.

The ROS, including H₂O₂, induced by Sb treatments, have involved a lipid peroxidation (LPO) of the polyunsaturated fatty acids, of which the final product is malondialdehyde (MDA). Such a result is highlighted by the very significant positive correlation of H₂O₂ contents with MDA.

MDA is a reliable indicator of free radical formation. It is used as a biomarker of toxicity in a variety of living organisms (Tsikas 2017). It indicates membrane damage leading to a disruption of the metabolic function and a reduction of cellular integrity, thus a decrease in growth. Such an effect, in the case of *A. tubingensis*, is highlighted by the significant negative correlations of the strain dry weight with its H₂O₂ and MDA contents and with the media Sb concentrations. These results are in accordance with the work of Mukherjee et al. (2010) which showed that lipid peroxidation increased steadily with the increase of arsenate amounts in *Aspergillus niger*. Similarly, Chakraborty et al. (2014) indicated that the peroxidation of *Aspergillus foetidus* cell membrane induced by cadmium, caused damages in cell wall.

The same results were observed by Benhamdi et al. (2014), they illustrated that MDA increased with soil Sb concentrations in the roots of *H. pallidum* Desf. from which *A. tubingensis* was isolated. This finding indicates a close relationship between the host plant and its endophyte.

The low MDA contents at 5 mM Sb would have caused insignificant membrane damage at this concentration, which explain the important biomass obtained at 5 mM than at 10, 20 and 30 mM Sb. However, contrary to H₂O₂ contents, MDA contents determined at the concentrations of 5, 10 and 20 mM Sb, were significantly higher than that of the control. This could be explained by the fact that other ROS than H₂O₂ were involved in the production of MDA.

The very significant and positive correlations of proline contents of *A. tubingensis* with Sb treatments, strain's H₂O₂ and MDA contents indicate that the intracellular proline increase with Sb concentrations of the medium, H₂O₂ and MDA contents. Such an increase shows that the production of proline was triggered by the presence of the ROS generated by the metalloids toxicity. It suggests that proline is involved in H₂O₂ removal and in preventing the lipid peroxidation. Furthermore, the negative correlation of proline with fungal growth suggests that this reduction, due to Sb toxicity, would be the inducing factor of proline production. Therefore, *A. tubingensis* produces intracellular proline to struggle the metalloids toxicity, reduce its deleterious effects on the metabolism, and prevent the reduction of the fungus growth. This

indicates an important adaptation of the fungal strain to the excessive contents of Sb. This adaptation seems more important at 5 mM Sb since the strain's proline contents are higher than at 0 and 10 mM Sb. Indeed, according to Raj and Mohan (2016), high levels of intracellular proline are specific characteristics of hypertolerant heavy metal populations. They suggest that intracellular proline have a functional role in high resistance to metals. The obtained results are corroborated by the works of Chakraborty et al. (2012, 2014): when studying the behavior of *Aspergillus foetidus* according to Pb (II) and Cd toxicity, they found out that intracellular proline increased in a gradual and significant way with that of the two elements in the medium.

Very significant positive correlations of proline with CAT and SOD suggest that proline production is related to the induction of these enzymatic activities. Indeed, according to the works of Zouari et al. (2016), on date palm (*Phoenix dactylifera* L. cv Deglet Nour), proline intervenes in alleviation of cadmium stress by promoting CAT activity. Not only could this be the case for *A. tubingensis* for CAT but also for SOD.

The significant increase in CAT activity with Sb treatments and H₂O₂ contents and their very significant positive correlations show that CAT activity is triggered by H₂O₂ contents, which are induced by Sb toxicity. It suggests that CAT is involved in H₂O₂ removal. In fact, catalases are known to be implied in one of the mechanisms that protect cells against cellular components damages caused by H₂O₂ and reactive oxygen species (ROS) (Teng et al. 2018). Moreover, according to these authors, catalase activity is directly regulated by H₂O₂ concentrations in the medium. So, the H₂O₂ formed by Sb toxicity would be eliminated by CAT, produced by *A. tubingensis*, that neutralizes or reduces its toxic effects. Such a result indicates an important adaptation of the fungal strain to the presence of excess Sb in the medium. This adaptation seems more accentuated at 5 mM Sb since CAT activity is higher than at 0 and 10 mM Sb. As it was for MDA, the CAT activity of the plant *H. pallidum*, had increased significantly with the increase of antimony pollution in soil (Benhamdi et al. 2014). Such an increase could therefore be related to the presence of *A. tubingensis* in *H. pallidum* roots.

Superoxide dismutase (SOD) is another antioxidant enzyme that protects cells against oxidative stress. Thus, the increase of SOD activity in *A. tubingensis* with increased Sb treatments, which are correlated significantly and positively, prove that the metalloid induced SOD activity of the strain.

Indeed, according to Demidchik (2015), SOD reacts with superoxide radicals (O₂^{•-}) to produce H₂O₂ and O₂. The production of H₂O₂ by SOD makes it possible to reduce the amount of O₂^{•-} produced by the stress and thus to prevent the formation of hydroxyl radicals (OH[•]) in the Haber-Weiss reaction. These hydroxyl radicals are the most reactive species causing LPO, consequently, MDA production. Therefore, the

very significant positive correlations of SOD with H₂O₂ and MDA suggest that SOD is involved in H₂O₂ and MDA production, so, in LPO prevention.

The H₂O₂, which is also an oxidant, would be eliminated by intracellular proline and CAT. This, therefore, explains the very significant positive correlations found between SOD, CAT activities, H₂O₂ and proline contents.

Benhamdi et al. (2014) also highlighted an increase in SOD activity of *H. pallidum* according to Sb contamination in soils. In addition, it was more important in *H. pallidum* roots than in its aerial parts. This suggests that *A. tubingensis* could play a role in increasing SOD activity of its host.

POD and APX belong to a group of oxidoreductases found in fungi which mediate electron transfer from hydrogen peroxide (H₂O₂) and organic peroxide to various electron acceptors (Choi et al. 2014). Consequently, the similarity of POD and APX activities graphs and their very significant positive correlation could be explained by the fact that they intervene in the same type of reaction.

Significant decrease of both POD and APX activities with increased Sb concentration and the very significant and negative correlations of these enzymes with Sb treatments highlight a relative inhibition of POD and APX activities by Sb toxicity. Such inhibition could be linked to the excessive H₂O₂ production, hence explaining the negative correlations of both enzymes activities with the strain's H₂O₂ contents. Indeed, according to Demidchik (2015), peroxidases could be inactivated by their substrate, hydrogen peroxide. Similarly, Feng et al. (2016) noted a reduction in APX and POD activities of paddy rice roots exposed to antimony and selenium. The low correlation between both enzymes activities and H₂O₂ contents may be explained by the fact that other ROS, such as hydroxyl radicals, would be involved in the inactivation of *A. tubingensis*'s peroxidases.

The very significant and negative correlations between MDA contents and both enzymes suggest that they are not involved in the LPO prevention.

Since peroxidases monitor a large variety of fundamental biological processes (Demidchik 2015), their inactivation inevitably leads to reduce the growth of *A. tubingensis*. This would explain the very significant positive correlations between both enzyme activities and the strain's dry weight.

Despite their decreases, the activities of the POD and the APX are still relatively important since, at a high concentration of Sb (30 mM ie 3,652.8 mg L⁻¹), they correspond to 78% and 71% of those recorded for the control, respectively. Therefore, this attests to an important adaptation of the strain to excessive levels of antimony. Such an adaptation also appears in the exceeding of both enzyme activities at 5 mM Sb compared to those of the control and the other Sb treatments.

The plant, *H. pallidum*, from which *A. tubingensis* was isolated, exhibited, on the contrary, an increase in the activities of both enzymes according to Sb increase in soil (Benhamdi

et al. 2014). This could be explained by the fact that peroxidases of *H. pallidum* differ from those of *A. tubingensis*.

Conclusion

The fungal endophyte *Aspergillus tubingensis* isolated, for the first time, from the roots of an antimony accumulator plant, *Hedysarum pallidum* Desf., showed a high resistance to antimony by growing up to 500 mM Sb in broth media.

This strain showed an important adaptation to Sb toxicity by the establishment of antioxidant biomolecules defense systems allowing the endophyte to fight the toxicity of the medium. It appears that proline, CAT and SOD interact to eliminate H₂O₂ and avoid lipid peroxidation, while POD and APX are not involved in such a mechanism.

Similarity in some antioxidant responses of *A. tubingensis* to Sb toxicity with those of the host plant suggests that the fungal strain would participate in the protection of *H. pallidum* in trapping at least part of the ROS.

These results indicate that *A. tubingensis* developed indigenous mechanisms to tolerate high Sb doses. Although this strain was originated from terrestrial environment, its resistance to Sb was demonstrated in a liquid medium. This suggests that this strain could be a potential agent for bioremediation of both soil and aquatic environments contaminated by antimony.

Acknowledgments We would like to thank the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for the financial support and the head of INRA Montpellier (France) for allowing us to achieve some of this work within its premises.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest No potential conflict of interest or financial disclosure for all authors. All persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

References

Bacal CJO, Yu ET (2017) Cellulolytic activities of a novel *Fomitopsis* sp. and *Aspergillus tubingensis* isolated from Philippine mangroves. *Philipp J Sci* 146:403–410

Benhamdi A, Bentellis A, Rached O, Du Laing G, Mechakra A (2014) Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two Steppic plant species in an old antimony mining area. *Biol Trace Elem Res* 158:96–104. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9917-7>

Bentellis A, Azzoug R, El Hadeif El Okki M, Rached O (2014) Trace elements pollution from an abandoned mine and factors affecting Antimony concentrations in the Dahimine Wadi Bank soils (Northeast Algeria). *Carpath J Earth Env* 9:95–106

Chakraborty S, Mukherjee A, Das TK (2012) Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: an implication of bioremediation of lead from liquid media. *Int Biodeterior Biodegradation* 84:134–142. <https://doi.org/10.1016/j.ibid.2012.05.031>

Chakraborty S, Mukherjee A, Khuda-Bukhsh AR, Das TK (2014) Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotox Environ Safe* 106:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.007>

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>

Choi J, Détry N, Kim KT, Asiegbu FO, Valkonen JPT, Lee YH (2014) fPoxDB: fungal peroxidase database for comparative genomics. *BMC Microbiol* 14:117. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-117>

Clemente R (2013) Antimony. In: Alloway BJ (ed) Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability, 3rd edn. Springer, Dordrecht, pp 497–506

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109:212–228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>

Deng Z, Cao L, Huang H, Jiang X, Wang W, Shi Y, Zhang R (2011) Characterization of Cd and Pb-resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in metal contaminated soils. *J Hazard Mater* 185:717–724. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.078>

Devi KA, Pandey G, Rawat AKS, Sharma GD, Pandey P (2017) The endophytic symbiont—*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L. *Front Microbiol* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01897>

Feng R, Liao G, Guo J, Wang R, Xu Y, Ding Y, Mo L, Fan Z, Li N (2016) Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. *Environ Exp Bot* 122:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.08.007>

Huang HB, Feng XJ, Liu L, Chen Bin LYJ, Ma L, She Z-G, Lin YC (2010) Three dimeric Naphtho-γ-Pyrone from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*. *Planta Med* 76:1888–1891

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275

Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H (2016) Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J Environ Manag* 174:14–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>

Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

Mubarak H, Chai LY, Mirza N, Yang ZH, Pervez A, Tariq M, Shaheen S, Mahmood Q (2015) Antimony (Sb) - pollution and removal techniques –critical assessment of technologies. *Toxicol Environ Chem* 97:1–22. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1095549>

Mukherjee A, Das D, Mondal SK, Biswas R, Das TK, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR (2010) Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotox Environ Safe* 73:172–182. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.015>

Nakano Y, Asada K (1980) Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol* 21:1295–1307. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076105>

Pierart A, Shahid M, Séjalon-Delmas N, Dumat C (2015) Antimony bioavailability: knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. *J Hazard Mater* 289:219–234. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.011>

Qayyum S, Khan I, Maqbool F, Zhao Y, Gu Q, Peng C (2016) Isolation and characterization of heavy metal resistant fungal isolates from industrial soil in China. *Pak J Zool* 48:1241–1247

Raj S, Mohan S (2016) Impact on proline content of *Jatropha curcas* in fly ash amended soil with respect to heavy metals. *J Pharm Pharm* 8:244–247

Teng Y, Du X, Wang T, Mi C, Yu H, Zou L (2018) Isolation of a fungus *Penicillium* sp. with zinc tolerance and its mechanism

- of resistance. *Arch Microbiol* 200:159–169. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1430-x>
- Tsikas D (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges. *Anal Biochem* 524:13–30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Zhang L, Xiao S, Li W, Feng W, Li J, Wu Z, Gao X, Liu F, Shao M (2011) Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot* 62:4229–4238. <https://doi.org/10.1093/jxb/err131>
- Zhou X, Sun C, Zhu P, Liu F (2018) Effects of antimony stress on photosynthesis and growth of *Acorus calamus*. *Front Plant Sci* 9:1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00579>
- Zouari M, Ben Ahmed C, Zorrig W, Elloumi N, Rabhi M, Delmail D, Ben Rouina B, Labrousse P, Ben Abdallah F (2016) Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Ecotox Environ Safe* 128:100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.015>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Original Research

Antioxidative Enzyme Responses to Antimony Stress of *Serratia marcescens* – an Endophytic Bacteria of *Hedysarum pallidum* Roots

Mounia Kassa-Laouar¹, Aicha Mechakra¹, Agnès Rodrigue², Ouissem Meghnous¹,
Alima Bentellis³, Oualida Rached^{3*}

¹Biology and Environment Laboratory, Faculty of Nature and Life Sciences, Mentouri University Constantine 1, Constantine, Algeria

²Laboratory of Microbiology, Adaptation and Pathogeny, University Lyon 1, France

³Biotechnology High National School Taoufik Khaznadar, Ali Mendjeli University City, Constantine, Algeria

Received: 1 October 2018

Accepted: 4 December 2018

Abstract

Studies on bacterial endophytes resistant to antimony (Sb), a pollutant deemed alarming, are virtually non-existent. An endophytic bacterial strain showing resistance to high antimony concentrations was isolated for the first time from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf., a Sb accumulator Fabacea growing on mining spoils. With the combined use of morphological, biochemical and molecular methods, the isolated strain was identified as *Serratia marcescens* species. It showed a minimum inhibitory concentration (MIC) to its growth at 450 mM of Sb. In the presence of excessive concentrations of Sb, corresponding to 30 mM of Sb, i.e., 3652.8 mg/L of Sb, the strain maintained important growth compared to the control. The Sb toxicity caused a significant increase ($p < 0.05$) in the hydrogen peroxide (H_2O_2) amount and malondialdehyde (MDA) content. The oxidative stress induced significant increases ($p < 0.05$) in the strain antioxidant biomarkers such as proline, catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD). Significant and positive correlations ($p < 0.05$) were found between oxidative and antioxidant biomarkers and between antioxidant biomarkers, highlighting the interrelationships between them in oxidative stress fighting. Results show an important adaptation of the strain to high Sb levels that can be used in the Sb-contaminated soils bioremediation.

Keywords: antioxidants; bacteria; endophyte; metalloid; mine spoils

Introduction

Antimony, a metalloid of molecular weight 121.75, is considered a toxic element and pollutant of concern whose increasing emissions are due to industrialization and mining [1, 2]. According to Mubarak et al. [3], the resulting carcinogenicity of such pollution requires the removal of this metalloid from the ecosystem. Therefore, the development of a remediation strategy for antimony-contaminated soils is necessary. Currently, the bioremediation is an effective and inexpensive method of metals elimination [3, 4]. It involves both plants and the indigenous rhizospheric microflora, such as metal-tolerant endophytic bacteria [5, 6]. This microflora is able to use these pollutants as nutrients for its proliferation [7]. Moreover, it stimulates the growth of its host and gives it a better adaptation to metallic stress [8, 9].

The bacterial exposure to high levels of heavy metals results in an overproduction of reactive oxygen species (ROS). This induces the production of antioxidant enzymes such as catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), and non-enzymatic compounds such as proline, which allow for an adaptation of bacteria to environmental stresses [10]. The measurement of these antioxidants makes it possible to highlight the degree of adaptation of bacteria to heavy metals (or metalloids) and therefore their possible use in the bioremediation of soils contaminated by them. Set apart from the description of some resistance mechanisms (efflux pump, methylation, complexation, oxidation-reduction reactions and microbe mediated electron transfert) of bacteria against heavy metals and metalloids, in particular antimony [11, 12], the role of the antioxidant system in bacteria towards this metalloid remains poorly described [10].

In northeastern Algerian, a previous study revealed very high Sb levels in soils surrounding spoils of an old antimony mine (up to 81.446 mg/kg) involving modifications of the spontaneous vegetation and the survival of certain resistant plants [13]. This is the case of *Hedysarum pallidum* Desf., a Fabaceae, which concentrates up to 263 mg/kg of Sb in its upper parts and 183 mg/kg of this element in its underground parts [14]. According to these authors, the adaptation of this plant to high Sb concentrations resulted in the activation of its antioxidant enzymes such as CAT, SOD, APX and POD.

Such results raise the question whether this plant contains endophytic bacteria in its roots, which have similar antioxidant enzyme activities and allow their host a better tolerance to the high levels of metals. Such bacteria would be potential candidates for bioremediation of antimony-contaminated soils.

The purpose of the present work is to highlight and identify the most antimony-resistant endophytic bacterium from *H. pallidum* roots by determining its MIC. It also aims at determining the tolerance strategy

of the resistant species to Sb by studying the impact of the metalloid on the production of reactive oxygen species, on lipid peroxidation, and on the antioxidant biomarkers.

The objective is also to better understand host-endophyte relationships and antioxidant molecule interactions in the antimony stress fighting.

Experimental

Sampling Zone Characteristics

The sampling station is located in the area of an old antimony mine situated on one side of the Djebel Hamimat mountain in northeastern Algeria at an average altitude of 865 m (35°58'37,64"N-7°11'22,80"E to 36°01'09,78"N-7°14'38,38 E) (Fig. 1). In this zone are Sb occurrences and several large mining excavations whose waste, conveyed by the Dahimine wadi, are the cause of important contamination of the surrounding area. The sampling area is a semi-arid region with steppic vegetation [13].

The sampling was carried out in March 2016 in the most contaminated station of the study area, which presents the following physicochemical properties as determined by previous authors [14]: 62000±4924 mg/kg of antimony (Sb), 2300±186 mg/kg of arsenic (As), 0.9±0.04% of organic matter (OM), 38.7±1.82% of CaCO₃, 23.0 ± 4.9% of Clay, 16.3±1.02% of Silt, 53.7±3.22% of sand and a pH of 8.01±0.09.

Plant Sampling

In the sampling station (Fig. 1) 8 specimens of *H. pallidum* were randomly chosen. Roots were extracted with a sterile auger, then taken with sterile gloves and introduced immediately into sterile jars after being separated from the aerial part by sterile scissors.

Endophytic Bacteria Isolation

The roots underwent superficial sterilization to eliminate epiphytic organisms according to the method described by Deng et al. [4] and Dombrowski et al. [15]. This one consisted in washing the samples under running tap water, followed by sequential treatments with 75% (v/v) ethanol for 2 minutes, sodium hypochlorite (NaOCl) (5%) for 1 minute and finally rinsing of the roots three times with sterile distilled water for 1 minute.

The roots were then cut into fragments of a few millimeters and placed on Petri dishes containing nutrient agar (NA) (pH 7.0) composed of 0.5% peptone, 0.3% meat extract, and 1.5% agar. The NA was supplemented with 10 mg/L of Amphotericin B (Wolfratshausen, Germany) to inhibit any fungal growth. The dishes were incubated at 30°C for one week. Each formed colony was isolated, purified and

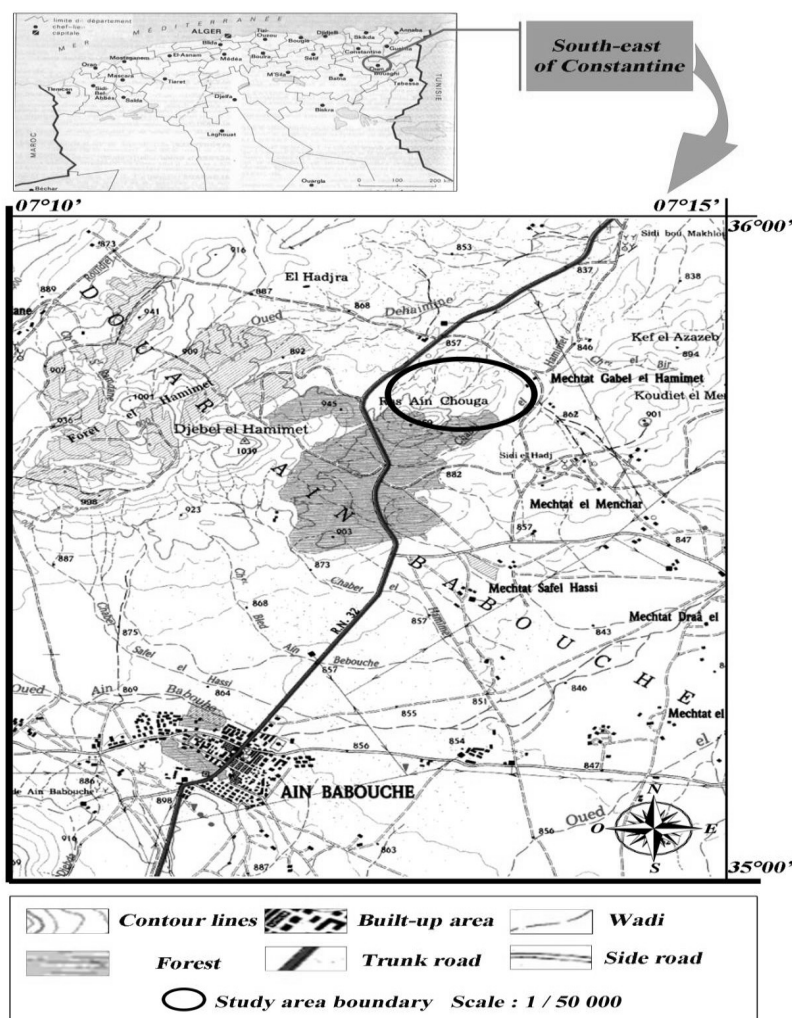


Fig. 1. Study area location.

stored at 4°C in Luria-Bertani (LB) containing 20% (v/v) glycerol.

To check the efficiency of roots disinfection, aliquots of 0.3 mL of the final rinsing water were spread on Petri dishes of the medium previously mentioned, and incubated under the same conditions as described above. The absence of any microbial growth on this medium indicated that all the isolated bacteria were endophytes [4].

MIC Determination of the Isolated Endophytes

A screening was performed with increasing doses of Sb (5-450 mM) on the set of the isolated bacteria, in order to determine their MICs and to highlight one or several antimony-resistant bacteria. For that, 0.5 mL of 24 h pre-culture containing approximately 4×10^5 CFU (colony-forming unit) were inoculated in tubes containing 10 mL of LB added with different metal concentrations ranging from 5 to 450 mM of Sb as $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$. The tubes were incubated in a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Co., Inc., NJ and USA) for 24h at 30°C and 150 rpm. The bacterial

growth was checked visually by appearance of turbidity in the culture medium. The lowest concentration of the metalloid, which inhibits the bacterial growth and which does not involve any apparent turbidity, was considered MIC [16].

Identification of Selected Sb-Resistant Bacteria

The identification of the resistant strain was based initially on morphological and physiological characteristics using selective culture media, the Gram staining reaction and the standard biochemical techniques. The isolate was further identified by conventional biochemical tests using the API 20E strips (BioMérieux, Inc. France). In the second step, the molecular identification of this strain was carried. 16S rDNA gene was amplified and sequenced using the sense and antisense primers: FD1 (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') and RP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (Sigma). These sequences were compared with similar sequences in the gene bank DNA database using BLAST analysis

(basic logical alignment search tool, at NCBI). Finally, the phylogenetic tree and evolutionary distances were calculated using the MEGA (molecular evolutionary genetic analysis) 7 program.

Determining Oxidative and Antioxidant Biomarkers

Preparing Bacterial Biomass

The biomass of the resistant strain was produced in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of LB medium modified by the removal of the *yeast extract* and the addition of citrate buffer (50 mM, pH 7) in place of the distilled water. The medium was then supplemented by potassium tartrate antimonyl trihydrate ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$ Sigma-Aldrich) with different concentrations, namely, 0, 5, 10, 20 and 30 mM of Sb. The maximum dose was determined by the minimum biomass quantity required to the realization of the toxicity biomarker analyses. Each flask containing the different metal concentrations (0 to 30 mM of Sb) was inoculated with 1 mL of a 24h pre-culture containing approximately 4×10^5 CFU. All cultures were performed in triplicate and shaken in a rotary incubator (New Brunswick Scientific, Co., Inc., NJ, USA) at 150 rpm at 30°C for 24h.

Bacterial growth was estimated by measuring the absorbance at 650 nm for each Sb concentration in the culture medium. The culture without metalloid (negative control) was considered as 100% of growth. The growth in the presence of Sb was then expressed as a percentage by reference to the negative control. The pH variations before and after fermentation were stabilized by the addition of the citrate buffer.

Enzymatic and MDA Extract Preparation

Biomass was harvested from liquid batch culture after 24h of incubation (30°C/150 rpm) by centrifugation at $8,000 \times g$ for 15 min at 4°C. The resulting cell pellet was washed with sterile deionized water and ground with a mortar under liquid nitrogen. The obtained powder was suspended in 50 mM ice-cold phosphate buffer (pH 7) containing 0.1% (v/v) triton X-100 and 1% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP). The cellular debris was removed by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C, and the obtained supernatant was used to determine the levels of lipid peroxidation and specific enzyme activities (CAT, POD, APX and SOD). The soluble protein levels were estimated by the procedure of Lowry et al. [17] using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Determining Intracellular H_2O_2

Hydrogen peroxide (H_2O_2) levels were determined according to the method described by Chakraborty et al. [18]. The biomass was homogenized in an ice bath

with 5 mL 0.1% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). The homogenate was centrifuged at $12000 \times g$ for 15 min. 0.5 mL of the supernatant were added to 0.5 mL of 10 mM phosphate buffer (pH 7) and 1 mL of 1 M KI. The absorbance was read at 390 nm, and the concentration of H_2O_2 was given by a standard curve.

Determining Malondialdehyde (MDA) Content

The content of malondialdehyde (MDA), the final product of lipid peroxidation, was assayed following Chakraborty et al. [19]. A 0.5 mL aliquot of the previous extract was added to 1 mL of 20% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and 0.5% (w/v) thiobarbituric acid (TBA). The mixture was incubated at 95°C for 30 min and the reaction was stopped by placing the tubes in an ice bath. Centrifugation was carried out for 10 min at $10,000 \times g$. The value for non-specific absorbance of the supernatant at 600 nm was subtracted from the value at 532 nm. The amount of MDA-TBA complex (red pigment) was calculated using the adjusted absorbance and molar extinction coefficient $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determining Intracellular Proline Content

Free proline content was determined by the method cited by Zhang et al. [20]. 0.1g of fresh biomass was ground in an ice bath, to which 2 mL of 40% (v/v) methanol were added. After incubation at 85°C for 1 h and cooling to room temperature, 1 mL of the extracted solution was mixed with 2 mL of acetic acid, 25 mg of ninhydrin and 1 mL of a mixture that contained: 120 mL acetic acid, 300 mL distilled water and 80 mL orthophosphoric acid. The homogenate was boiled for 30 min, and subsequently placed in an ice bath to stop the reaction. To allow phases separation, toluene was added to the mixture and shaken vigorously. The intensity of the red color of the upper phase was read at 528 nm. The intracellular proline concentration was determined using the molar extinction coefficient $0.62 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and calculated on a fresh weight basis.

Antioxidant Enzyme Activity Measurements

Catalase (CAT) activity (EC.1.11.1.6) was measured using the method used by Chandrakar et al. [21]. The hydrogen peroxide decomposition was followed by measuring the decrease in absorbance at 240 nm every minute within the first three minutes of the reaction. The CAT activity was determined using the extinction coefficient $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and specific activity was given as $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteins. Peroxidase (POD) activity (EC.1.11.1.7) was assayed by the method described by Benhamdi et al. [14]. The amount of purpurogalin released after the reaction of pyrogallol with H_2O_2 was measured at 420 nm. The enzymatic activity corresponded to 0.1 absorbance $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein as one unit. Ascorbate peroxidase

(APX) activity (EC.1.11.1.11) was assayed according to Djébalı et al. [22] by measuring the decrease in the absorbance of oxidized ascorbate at 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The APX activity was expressed as $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein. Total activity of superoxide dismutase (SOD) (EC.1.15.1.1) was quantified according to the method reported by Abdalla et al. [23]. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme required to cause 50% pyrogallol autooxidation inhibition at 420 nm; it was expressed as U mg^{-1} protein.

Statistical Analysis

The mean of the experimental results ($n = 3$) and their standard errors (SEM) are represented in bar graphs. The significance of the differences between the means is estimated using a variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's test. The relationships between all variables analyzed and between those and Sb concentrations of the medium was tested by the Pearson correlation coefficients (r). The data treatment was carried out using XLStat 2014 software.

Results and Discussion

Identifying the Antimony-Resistant Endophyte Bacteria

One hundred and forty-eight bacterial strains were isolated from the roots of *H. pallidum*. The screening revealed that the H₆R₁B bacterium is the most resistant to antimony, because it is the only one that was able to grow in the presence of up to 425 mM of Sb, i.e., 51748 mg/L of Sb. The MIC of this isolate would therefore be 450 mM of Sb. The other isolates showed much lower MICs not exceeding 250 mM of Sb.

The Gram-staining reaction of H₆R₁B bacterium showed that this strain is a Gram-negative rod-sharp bacteria. According to its morphology, cultural appearance, physiological and biochemical characteristics, using API 20E strips, the H₆R₁B bacterium could be *Serratia marcescens* (72%). The amplification, sequencing and alignment of its 16S rRNA gene sequence with GenBank reference sequences had confirmed that this strain is *Serratia marcescens* with 99% identity (Fig. 2). *Serratia* genus was created by Bizio, who chose this name to honor the memory of the celebrated Italian physicist Serafino Serrati. Some strains produce a red pigment, the prodigiosin. The term *marcescens*, meaning decaying in latin, was used because of pigment's decay and its dissolution into a fluid and viscous matter, which has a mucilaginous appearance upon reaching maturity [24].

Although generally considered a pathogenic microorganism for humans and animals [25], this species is recognized as a rhizobacterium promoting

plant growth. Indeed, it has been used to enhance the growth of tropical and medicinal plants, the chaff-flower (*Achyranthes aspera*) [26] and in the induction of phenols and defense enzymes in an Asian medicinal plant, the betelvine [27]. When isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*), it allowed induction of cold resistance of wheat seeds [28]. Thus, it is not very surprising that this species is an endophyte, which is resistant to a toxic metalloid.

Growth of the Bacterial Endophyte *Serratia marcescens*

The effect of the added Sb on the growth of *Serratia marcescens* grown on submerged cultivation in the presence of increasing Sb concentrations is represented in Fig. 3a). *S. marcescens* growth shows an important gradual decrease with the increase of Sb concentration in the culture medium. It is significantly and negatively correlated ($p < 10^{-3}$) with the metalloid concentration (Table 1). The growth reduction rates are 9%, 15.5%, 21.5% and 38% relative to the control at concentrations of 5, 10, 20 and 30 mM of Sb, respectively. At 30 mM of Sb the strain still produces 62% of biomass relative to the growth of the control.

The significant decrease in *S. marcescens* growth according to the increase of Sb concentrations highlights the toxic effect of this metalloid on this strain. This is also evidenced by the negative and very significant correlation of growth with Sb concentrations. Such a decrease can be explained by a likely modification of the physiological mechanisms of tested strain in response to Sb toxicity. Indeed, according to Bahar et al. [29], to Siripornadulsil and Siripornadulsil [30] and to Chakraborty et al. [18], non-lethal metallic amounts (Sb in our study) induce a disturbance in the membrane permeability of the bacterial cell and consequently an important loss of essential nutrients for bacterial growth.

Moreover, despite the toxic effect of Sb, *S. marcescens* preserved approximately 62% of its growth at 30 mM of Sb compared to the control. Such growth for such high concentration, corresponding to 3652.8 mg/L Sb, could be explained by the prior adaptation of the strain to high Sb levels in the origin area rich with heavy metals – especially antimony. Our results are in agreement with several works, in particular those of Cernansky et al. [31] and Chakraborty et al. [18], who reported that microorganisms isolated from the heavy metal-contaminated environments develop the adaptive ability to sustain themselves in such environments.

Toxicity Biomarkers

Intracellular H₂O₂ Contents

The intracellular H₂O₂ levels of *S. marcescens* (Fig. 3b.) increased slightly at 5 and 10 mM of Sb,

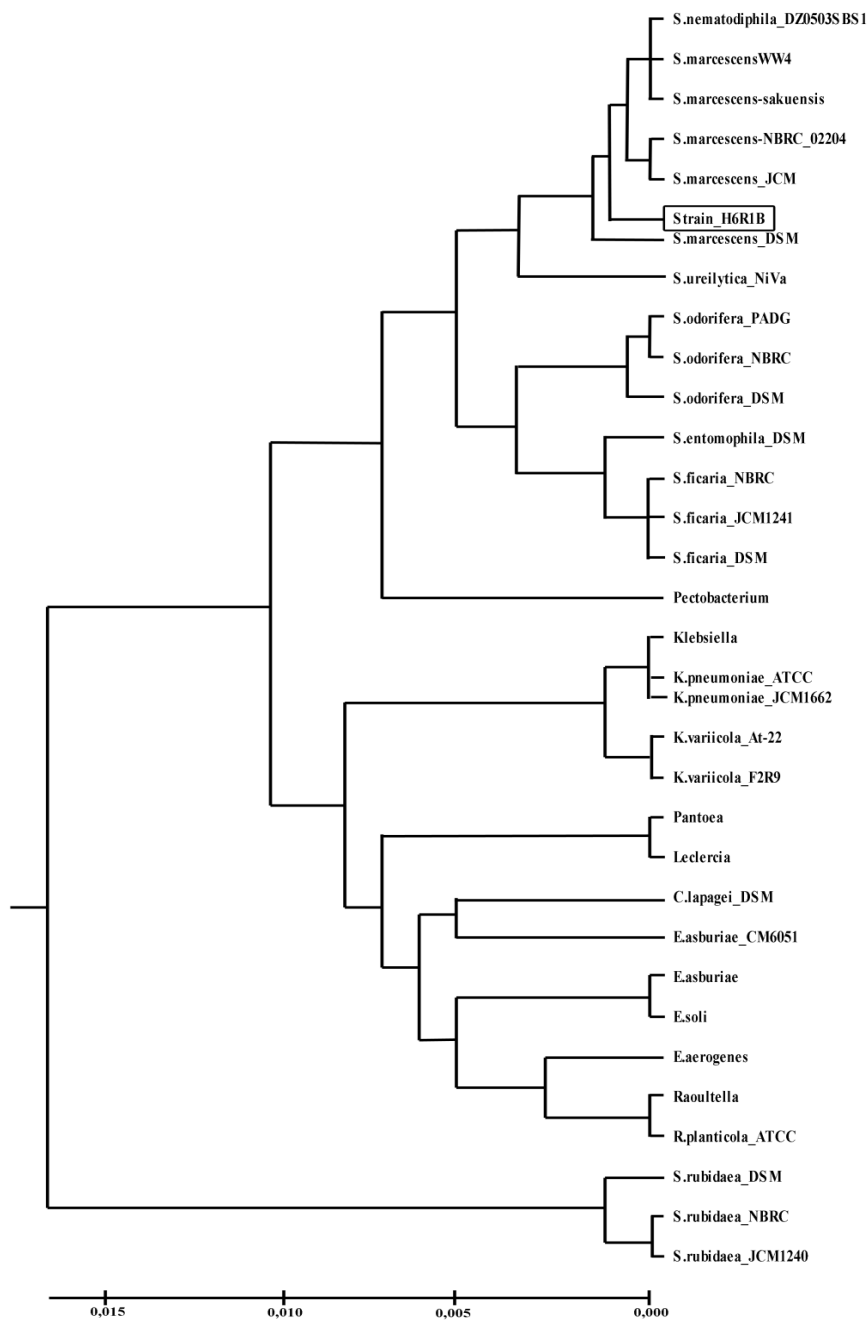


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationship between H₆R₁B bacteria and *Serratia marcescens* by 16SrDNA gene analysis.

with an increase of 23.02% and 45.36% compared to the control. At 20 and 30 mM of Sb, they show an important and very important increase, reaching respectively 356.5% and 445% compared to the control. However, they progress in the opposite direction of the growth rates of *S. marcescens*. Moreover, they are correlated very significantly and positively ($p < 10^{-3}$) with Sb concentrations of the medium, but negatively and very significantly ($p < 10^{-3}$) with the strain growth rates (Table 1).

The significant increase in intracellular H₂O₂ contents with the gradual increase of Sb concentrations, and their very significant positive correlation, showed that the increase of H₂O₂ in the bacterium is due to

Sb presence in the medium. Thus, the presence of important Sb quantities in the medium has induced the formation of reactive species (ROS), of which H₂O₂ is one. This latter is a strong oxidant, even at relatively low concentrations. According to Sharma et al. [32], it could cause oxidative damage to the lipid layer of the cell membrane by the peroxidation of polyunsaturated fatty acids and, consequently, disruption of the metabolic function and losses of cellular integrity. Such damages inevitably lead to a decrease in growth, which is evidenced by the very significant negative correlation between the H₂O₂ content and *S. marcescens* growth rate.

Table 1. Pearson correlation coefficients between all analyzed variables and between those and antimony culture medium concentrations; * $p < 0.05$, ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ (n = 15).

	Growth	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	POD	APX	SOD
Sb (mM)	-0,967***	0,972***	0,108	0,290	0,698**	-0,121	0,422	-0,081
Growth	1	-0,905***	-0,094	-0,233	-0,609*	-0,121	0,422	0,006
H ₂ O ₂		1	0,026	0,295	0,727**	-0,267	0,286	-0,247
MDA			1	0,774**	0,536*	0,875***	0,850***	0,773**
Proline				1	0,744**	0,594*	0,760**	0,507*
CAT					1	0,214	0,590*	0,148
POD						1	0,825**	0,959***
APX							1	0,829**

MDA Contents

After 24 h of bacterial growth, the MDA contents increased gradually and significantly ($p < 0.05$) at 5 and 10 mM of Sb by 48% and 121%, respectively, compared to the control. At 20 mM of Sb treatment, a non-significant decrease is observed. Then, at 30 mM of Sb the MDA content decreases significantly ($p < 0.05$) with increasing metal stress (Fig. 3c.), and the MDA contents were not correlated with either Sb contents, growth, or H₂O₂ contents (Table 1). However, when the values obtained at 30 mM of Sb were omitted, the MDA contents become significantly and positively correlated with the Sb ($r = 0.809$, $p < 10^{-2}$, $n = 12$) and H₂O₂ contents ($r = 0.587$, $p < 0.05$, $n = 12$) and significantly and negatively with growth ($r = -0.885$, $p < 10^{-2}$, $n = 12$).

According to Ayala et al. [33], the lipid peroxidation process produces multiple breakdown molecules, such as MDA, which promotes intramolecular or intermolecular protein/DNA crosslinking, which may induce profound alteration in the biochemical properties of biomolecules. Thus, the significant elevation in the MDA content with the rise of Sb concentrations and the significant and positive correlation of these two parameters of up to 20 mM of Sb, show that the presence of high concentrations of this metalloid in the culture medium can be responsible for the lipid peroxidation of the *S. marcescens* membrane and thus a high MDA production. This one would be responsible for the alteration of the biochemical properties of biomolecules of *S. marcescens*, leading to growth reduction, which is highlighted by the significance and negative correlation of MDA with the growth of the strain up to 20 mM of Sb.

The non-existence of correlation between Sb and MDA contents, when all values are considered, is related to the significant decrease in MDA content at 30 mM of Sb. This can be explained by the fact that a very high amount of H₂O₂ is produced at 30 mM of Sb, causing an important alteration of the strain metabolic functions, which caused the fall of the MDA production itself. This is also reflected in the lack of correlation between

MDA and H₂O₂ when all obtained values are introduced. The weakly significant correlation of both variables when obtained values at 30 mM of Sb are omitted can be explained by the fact that other unmeasured ROS than H₂O₂, such as OH· and O₂⁻, are involved in the lipid peroxidation process, of which the MDA is the product.

Intracellular Proline Contents

The obtained results (Fig. 3d) show that the proline contents of the fresh bacterial biomass increased significantly ($p < 0.05$) with the increase in Sb concentrations. At 5, 10 and 20 mM of Sb, this increase is approximately 59.26%, 65.39% and 114.47% respectively, compared to the control. However, a decrease in the proline content at 30 mM of Sb is noticed with about 39.77% compared to the maximum value. The proline contents were significantly and positively ($p < 0.05$) correlated with MDA contents, CAT, POD, APX, and SOD activities, but they were not correlated with either Sb concentrations, growth, or H₂O₂ contents (Table 1). However, when we omitted the values obtained at 30 mM of Sb, thus $n = 12$, the proline contents became correlated very significantly and positively with the contents of Sb ($r = 0.907$, $p < 10^{-3}$) and H₂O₂ ($r = 0.835$, $p < 10^{-2}$) and very significantly and negatively to growth ($r = -0.899$, $p < 10^{-3}$).

Proline is an amino acid that acts as a chelating agent for some heavy metals; it reduces the harmful effects of ROS by inhibiting lipid peroxidation because it is a scavenger of the ROS and other free radicals [34]. Thus, its significant increase as a function of Sb concentrations of up to 20 mM of Sb and its positive and significant correlation with MDA and H₂O₂ contents, show that its production was induced by the presence of elevated concentrations of Sb in order to fight against lipid peroxidation caused by H₂O₂ toxicity. Furthermore, the negative correlation of proline with growth, for concentrations below 30 mM of Sb, suggests that the reduction of growth, due to Sb toxicity, would be the triggering factor of proline production. Therefore,

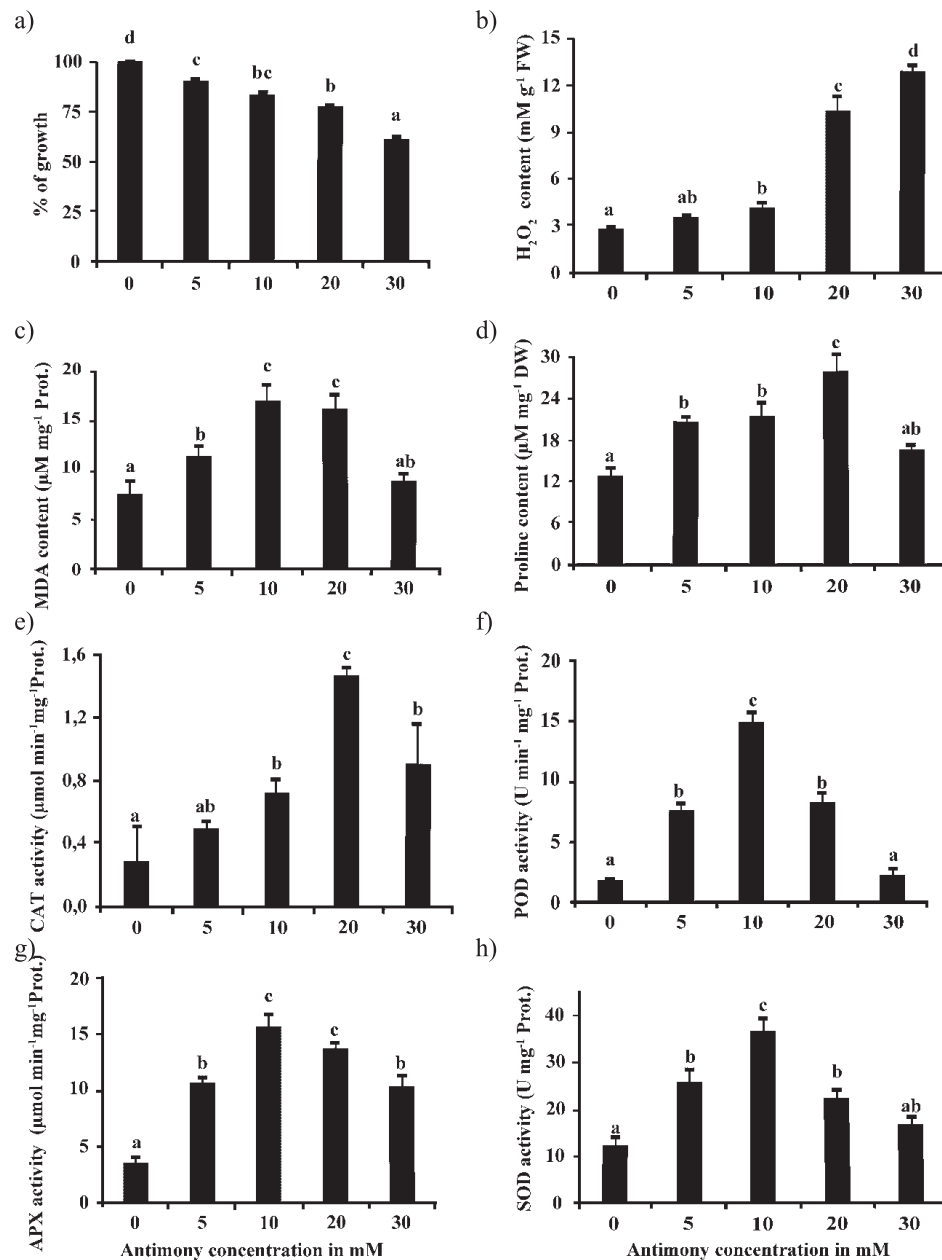


Fig. 3. Antimony effect on physiological parameters of the endophytic *Serratia marcescens* isolated from *Hedysarum pallidum* roots; growth percentage a), H_2O_2 contents b), MDA contents c), proline contents d), and the activities of CAT e), POD f), APX g), and SOD h) measured according to Sb concentrations in millimolar (mM); values represent means \pm SEM (n = 3), and different letters discriminate statistical differences between the measured parameters at the different Sb concentrations (using ANOVA followed by Tukey's test, $p < 0.05$).

proline would have been produced by *S. marcescens* to counteract the toxicity of the metalloid and reduce its deleterious effects on the metabolism and to prevent an important decrease in the growth of the bacteria. The absence of correlation with these same variables and with growth, when the obtained values at 30 mM of Sb are taken into account, can be explained by the sharp decrease in the proline content at this concentration. This decrease indicates a disruption in the cellular detoxification mechanism by proline at high antimony concentrations. These findings are in agreement with previous results reported by Anki and Leblon [35],

who found that proline was the main response of *Corynebacterium glutamicum* when it is exposed to hyperosmotic stress conditions. Significant and positive correlations of proline with CAT, POD, APX, and SOD suggest that proline production would be related to the induction of these enzyme activities. In fact, according to the works of Öztürk and Demir [36] on plants, CAT and POD would be activated by proline, which also acts as a protector of the activity of these enzymes. This could be the case for *S. marcescens* not only for CAT and POD but also for APX and SOD.

Antioxidant Enzyme Activities

A progressive and significant increase ($p < 0.05$) in CAT activity was observed with the increase in Sb concentrations of up to 20 mM of Sb (Fig. 3e). The rise of this activity was about 1.8-fold, 2.6-fold and 5.25-fold at 5, 10 and 20 mM of Sb respectively, in comparison to the control. However, a significant decrease ($p < 0.05$) in CAT activity was observed at 30 mM of Sb. The activity of this enzyme is significantly and positively correlated with Sb, H_2O_2 , proline and MDA contents and APX activity ($p < 0.05$), but significantly and negatively with growth ($p < 0.05$) (Table 1).

APX activity (Fig. 3g) reached its maximum at 10 and 20 mM of Sb with a significant increase ($p < 0.05$) of about 4.33-fold over control. A significant decrease ($p < 0.05$) in enzymatic activity was observed at 30 mM Sb. However, this apparent decrease in enzyme activity was still superior to the control by 2.88-fold. The APX activity was correlated, significantly and positively ($p < 0.05$), with all measured variables except growth, Sb and H_2O_2 contents (Table 1). When one withdraws the obtained data at 30 mM, therefore $n = 12$, the APX activity becomes significantly and positively correlated to Sb concentrations ($r = 0.753$, $p < 10^{-2}$) and significantly and negatively to growth ($r = -0.876$, $p < 10^{-2}$), but not to the H_2O_2 content. However, when only data obtained for concentrations lower than 20 mM Sb are taken into account ($n = 9$), the correlations between APX activity and H_2O_2 contents become very significant: $r = -0.953$, $p < 10^{-3}$.

Significant increases in CAT and APX activities as a function of Sb concentrations prove that the presence of this toxicant in the culture medium has induced their activities in *S. marcescens*. The production of these two enzymes has been increased by the bacterium to fight against lipid peroxidation caused by H_2O_2 generated by Sb toxicity. Indeed, both use hydrogen peroxide (H_2O_2) as a substrate to yield water (H_2O) and oxygen (O_2). This reaction is essential for the detoxification of the ROS generated during stress conditions. It protects lipids, proteins and cellular nucleic acids from damage caused by H_2O_2 and other ROS [32]. Such a role is confirmed by the positive and significant correlations of both enzyme activities with the MDA contents for all Sb concentrations, and with the H_2O_2 contents of up to 30 mM of Sb, for CAT, and up to 10 mM of Sb for APX. Such a correlation can be explained by the fact that under oxidative stress conditions, excess generation of H_2O_2 may cause the depletion of reduced ascorbate, which inactivates APX, as that is reported by Watanabe and Nakajima [37]. According to Mizuno et al. [38] CAT and APX cooperate for protection against H_2O_2 generated by abiotic stress, which explains the positive and significant correlation between these two enzymes.

However, according to Watanabe and Nakajima [37] considering the enzyme stability under oxidative stress conditions, CAT is much superior to APX as a stress-resistant enzyme. This would explain the fact that

CAT, unlike APX, is correlated with H_2O_2 contents up to 30 mM of Sb. Nevertheless, the intracellular H_2O_2 hyperproduction at 30 mM of Sb by isolated strain, due to the excess of the metalloid, would have also resulted in the significant reduction of CAT activity. Indeed, Polidoros and Scandalios [39] have also reported that CAT activity is directly regulated by H_2O_2 concentration whose high accumulation may reduce the activity of this enzyme. Negative and significant correlations of CAT and APX activities with bacterial growth mean that the activities of these enzymes increase as growth decreases. This correlation is explained by the fact that the decrease in growth is caused by the lipid peroxidation of the cell membranes, generated by the increase of intracellular H_2O_2 and thus the increase in the activities of the two enzymes. Benhamdi et al. [16] had also found a significant increase in CAT and APX activities of *Hedysarum pallidum* roots growing in the most polluted areas by Sb. It is therefore quite probable that *S. marcescens*, endophyte of *H. pallidum* roots, had an impact on the production of both enzymes of this plant, allowing it to resist the stress of high Sb concentrations. In addition, according to Hamilton et al. [40], root endophytes may increase host tolerance to various stresses via mechanisms involving reactive oxygen species and antioxidants.

It appears that the POD and SOD activities have similar bar graphs (Figs 3f, h). Indeed, their activities increased significantly ($p < 0.05$) up to 10 mM of Sb, where they reach their highest levels: 4.5-fold and 8-fold, respectively, than the control. Then they decreased significantly ($p < 0.05$) while remaining higher than those of the control. Both POD and SOD activities were positively correlated between them and they were correlated very significantly ($p < 10^{-3}$) to MDA, APX activity, and proline. They only become correlated significantly and negatively with growth once the values obtained at 30 mM of Sb are subtracted: $r = -0.882$ ($p < 10^{-2}$) for POD and $r = -0.557$ ($p < 0.05$) for SOD. When the data obtained for concentrations greater than 10 mM of Sb are subtracted ($n = 9$), the correlations between the SOD and POD activities and the Sb and H_2O_2 contents and CAT activity become significant to very significant: respectively, $r = 0.993$ ($p < 10^{-3}$); $r = 0.973$ ($p < 10^{-3}$); $r = 0.827$ ($p < 10^{-2}$) for POD and $r = 0.980$ ($p < 10^{-3}$); $r = 0.955$ ($p < 10^{-3}$) and $r = 0.838$ ($p < 10^{-3}$) for SOD.

Superoxide dismutase (SOD) is another key enzyme that protects cells against oxidative stress by catalyzing the dismutation of superoxide radical (O_2^-) to oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [32]. This latter is itself a powerful oxidant which is broken down then by POD, APX and CAT. Thus, the significant increases of SOD and POD activities with the Sb concentrations and their very significant and positive correlations with these last, up to 10 mM of Sb, prove, as for CAT and APX, that the presence of this metalloid in the culture medium has induced their activities in *S. marcescens*. The decrease in SOD and POD activities, after 10 mM

of Sb, can be explained, as for APX, by the sensitivity of these enzymes to high H₂O₂ levels [41]. This explains the significant and positive correlations between these three enzymes and the fact that SOD and POD are only correlated with CAT for values below 10 mM of Sb, which is less sensitive to high H₂O₂ levels. In the work of Benhamdi et al. [16] the activities of SOD and POD of *H. pallidum* roots were all the higher as soil Sb concentrations were higher. But SOD and POD activities of *S. marcescens* were reduced when Sb concentrations were higher in medium. This could be explained by the fact that, according to Welinder [42], both enzymes differ from those of bacteria.

Conclusions

Hedysarum pallidum Desf., a Fabacea of the semi-arid steppic regions, growing on antimony mining spoils and accumulator of this metalloid, has been found to harbor several endophytic bacteria within its roots. Among these, one strain was able to grow up to 425 mM of Sb in the medium. It was identified as *Serratia marcescens* by sequencing and comparison of its 16S rRNA gene sequence with GenBank data.

The presence of excessive Sb concentrations, corresponding to 3652.8 mg/L, in *S. marcescens* culture medium, caused high accumulation of hydrogen peroxide in the bacteria cells, leading to lipid peroxidation and therefore a decrease in its growth. This latter remained relatively high compared to the control, despite the toxicity of the medium, and reflects an important adaptation of the isolated strain to excessive Sb concentrations. This adaptation also resulted in the ability of the strain to fight ROS by inducing increased production of proline and antioxidant enzymes, such as CAT and APX, at the most excessive Sb doses. The induction of SOD and POD activities, very sensitive enzymes to H₂O₂ excess, up to Sb concentrations reaching levels of 1216.6 mg/L, is another proof of the adaptation of *S. marcescens* to Sb toxicity. Correlations show that the strain implements, at the same time, its antioxidant molecules to fight the antimony stress up to the threshold of 1216.6 mg/L Sb, but when this threshold is exceeded only the least sensitive molecules are involved, namely proline, CAT and APX.

The strain's ability to produce a sufficient biomass up to 3652.8 mg/L Sb in the culture medium and to produce high levels of antioxidant biomarkers attests of its high resistance to excessive levels of antimony. Such an ability, similar to that of its host, suggests that *S. marcescens* is involved in the aptitude of its host, *Hedysarum pallidum*, to grow on the mining spoils and to accumulate antimony. This could make *Serratia marcescens*, alone or associated with its plant host, a potential candidate for bioremediation of antimony-contaminated soils.

Acknowledgements

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- ZHOU Y., REN B., HURSTHOUSE A., ZHOU S. Antimony ore tailings: Heavy metals, chemical speciation, and leaching characteristics. Polish Journal of Environmental Studies, **28**, 1, DOI: 10.15244/pjoes/85006, **2019**.
- PIERART A., SHAHID M., SÉJALON DELMAS N., DUMAT C. Antimony bioavailability: Knowledge and research perspectives for sustainable agricultures. Journal of Hazardous Materials, **289**, 219, **2015**.
- MUBARAK H., LI-YUAN CHAI L-Y., MIRZAN., YANG Z-H., PERVEZ A., TARIQ M., SHAHEEN S., MAHMOOD Q. Antimony (Sb) _ pollution and removal techniques _ critical assessment of technologies. Toxicological and Environmental Chemistry, **97**,1296, **2015**.
- DENG Z., CAO L., HUANG H., JIANG X., WANG W., SHI Y., ZHANG R. Characterization of Cd- and Pb- resistant fungal endophyte *Mucor* sp. CBRF59 isolated from rapes (*Brassica chinensis*) in metal contaminated soils. Journal of Hazardous Materials, **185**,717, **2011**.
- SRIVASTAVA S., VERMA P.C., CHAUDHRY V., SINGH N., ABHILASH P.C., KUMAR K.V., SHARMA N., SINGH N. Influence of inoculation of arsenic-resistant *Staphylococcus arlettae* on growth and arsenic uptake in *Brassica juncea* (L.) Czern. Var. R-46. Journal of Hazardous Materials, **262**, 1039, **2013**.
- WEVAR OLLER A.L., TALANO M.A., AGOSTINI E. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from the rhizosphere of soybean plants from Argentinean agricultural soil. Plant Soil, **369**, 93, **2013**.
- DAS S., JEAN J.S., KAR S., LIU C.C. Changes in bacterial community structure and abundance in agricultural soils under varying levels of arsenic contamination. Geomicrobiology Journal, **30**, 635, **2013**.
- IQBAL S., HAMEED S., SHAHID M., HUSSAINE K., AHMAD N., NIAZ M. In vitro characterization of bacterial endophytes from tomato (*Solanum lycopersium* L.) for beneficial traits. Applied Ecology and Environmental Research, **16**, 1037, **2018**.
- YASIN N.A., KHAN W.U., AHMAD S.R., AHMAD A., AKRAM W., IJAZ M. Role of *Acinetobacter* sp. CS9 in Improving Growth and Phytoremediation Potential of *Catharanthus longifolius* under Cadmium Stress. Polish Journal of Environmental Studies, **28**, 1, DOI: 10.15244/pjoes/80806, **2019**.
- MA Y., RAJKUMAR M., ZHANG C., FREITAS H. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. Journal of Environmental Management, **174**, 14, **2016**.

11. GUO H., LIU Z., DING S., HAO C., XIU W., HOU W. Arsenate reduction and mobilization in the presence of indigenous aerobic bacteria obtained from high arsenic aquifers of the Hetao basin, Inner Mongolia. *Environmental Pollution*, **203**, 50, **2015**.
12. SELVANKUMAR T., RADHIKA R., MYTHILI R., ARUNPRAKASH S., SRINIVASAN P., GOVARTHANAN M., HYUNOOK K. Isolation, identification and characterization of arsenic transforming exogenous endophytic *Citrobacter* sp. RPT from roots of *Pteris vittata*. *3 Biotech*, **7**, 264, **2017**.
13. RACHED-MOSBAH O., GARDOU C. Soil-plant relationship in pastoral areas with a rich antimony substrate: example of Jebel Hamimat (Algeria). *Phytosociological Symposium XVI: Phytosociology and pastoralism*, Paris, 307, **1988** [In French].
14. BENHAMDI A., BENTELLIS A., RACHED O., LAING G.D., MECHAKRA A. Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two stepic plant species in an old antimony mining area. *Biological Trace Element Research*, **158**, 96, **2014**.
15. DOMBROWSKI J.E., HOLLENBECK V.G., MARTIN R.C. Isolation and Identification of Bacterial Endophytes from Grasses along the Oregon Coast. *American Journal of Plant Sciences*, **8**, 574, **2017**.
16. SEN S.K., RAUTA S., DORA T.K., MOHAPATRA P.K.D. Contribution of hot spring bacterial consortium in cadmium and lead bioremediation through quadratic programming model. *Journal of Hazardous Materials*, **265**, 47, **2014**.
17. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265, **1951**.
18. CHAKRABORTY S., MUKHERJEE A., KHUDA-BUKHSH A.R., DAS T.K. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **106**, 46, **2014**.
19. CHAKRABORTY S., MUKHERJEE A., DAS T.K. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: An implication of bioremediation of lead from liquid media. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **84**, 134, **2012**.
20. ZHANG L., XIAO S., LI W., FENG W., LI J., WU Z., GAO X., LIU F., SHAO M. Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4229, **2011**.
21. CHANDRAKAR V., DUBEY A., KESHAVKANT S. Modulation of antioxidant enzymes by salicylic acid in arsenic exposed *Glycine max* L., *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **16**, 662, **2016**.
22. DJEBALI N., MHADHBI H., LAFITTE C., DUMAS B., ESQUERRE-TUGAYE M.T., AOUANI M. E., JACQUET C. Hydrogen peroxide scavenging mechanisms are components of *Medicago truncatula* partial resistance to *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology*, **131**, 559, **2011**.
23. ABDALLA A.N., ALMALIKI W.H., MUKHTAR M.H., ANWAR F., SHAHID I., MENSRAWI S.A., ALSULIMANI T.S. Ameliorative influence of dietary dates on doxorubicin-induced cardiac toxicity. *Pharmacology and Pharmacy*, **7**, 343, **2016**.
24. MERLINO C.P. Bartolomeo Bizio's Letter to the most Eminent Priest, Angelo Bellani, Concerning the Phenomenon of the Red Colored Polenta. *Journal of Bacteriology*, **9** (6), 527, **1924**.
25. OCHIENG J. B., BOISEN N., LINDSAY B., SANTIAGO A., OUMA C., OMBOK M., FIELDS B., STINE O. C., J. P NATARO. *Serratia marcescens* is injurious to intestinal epithelial cells, *Gut Microbes*, **5**, 729, **2014**.
26. DEVI K.A., PANDEY P., SHARMA G.D. Enhances the Growth of *Achyranthes aspera* L., a Medicinal Plant. *Hayati Journal of Biosciences*, **23**, 173, **2016**.
27. LAVANIA M., CHAUHAN P.S., CHAUHAN S.V.S., SINGH H.B., NAUTIYAL C.S. Induction of Plant Defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Current Microbiology*, **52**, 363, **2006**.
28. SELVAKUMAR G., MOHAN M., KUNDU S., GUPTA A.D., JOSHI P., NAZIM S., GUPTA H.S. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbitapepo*). *Letters in Applied Microbiology*, **46**, 171, **2008**.
29. BAHAR M.M., MEGHARAJ M., NAIDU R. Kinetics of arsenite oxidation by *Variovorax* sp. MM-1 isolated from a soil and identification of arsenite oxidase gene. *Journal of Hazardous Materials*, **262**, 997, **2013**.
30. SIRIPORNADULSIL S., SIRIPORNADULSIL W. Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **94**, 94, **2013**.
31. CERNANSKY S., URIK M., SEVC J., LITTERA P., HILLER E. Biosorption of arsenic and cadmium from aqueous solutions. *African Journal of Biotechnology*, **6**, 1932, **2008**.
32. SHARMA P., JHA A.B., DUBEY R.S., PESSARAKLI M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *Journal of Botany*, Volume **2012**.
33. AYALA A.F., MUÑOZ M., ARGÜELLES S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume **2014**, ID 360438.
34. HAYAT S., HAYAT Q., ALYEMENI M. N., WANI A. S., PICHTEL J., AHMAD A. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling and Behavior*, **7**, 1, **2012**.
35. ANKI S., LEBLON G. Genetic and Biochemical study of proline biosynthesis regulation during the hyperosmotic stress response of *Corynebacterium glutamicum*. Doctoral Thesis, University Paris 11, Orsay, France, **1996**.
36. ÖZTÜRK L., DEMIR Y. *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regulation* **38** (3), 259, **2002**.
37. WATANABE Y., NAKAJIMA H. Peptide, protein and enzyme design, Chapter twenty - Creation of a thermally tolerant peroxidase. *Methods in Enzymology*, **580**, 2, **2016**.
38. ANJUM N.A., SHARMA P., GILL S.S., HASANUZZAMAN M., KHAN E.A., KACHHAP K., MOHAMED A.A., THANGAVEL P., DEVI G.D., VASUDHEVAN P., SOFO A., KHAN N.A., MISRA A.N., LUKATKIN A.S., SINGH H.P., PEREIRA E., TUTEJA N. Catalase and ascorbate peroxidase, representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**, 19002, **2016**.
39. POLIDOROS A.N., SCANDALIOS J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, **106**, 112, **1999**.

-
40. HAMILTON C.E., GUNDEL P.E., HELANDER M., SAIKKONEN K. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants. *Fungal Diversity*, **54**, 1, **2012**.
 41. VALDERRAMA B., AYALA M., VAZQUEZ-DUHALT R. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chemistry and Biology*, **9**, 555, **2002**.
 42. WELINDER K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, **2**, 388, **1992**.

Résumé

La libération d'antimoine inorganique dans le sol est devenue un sérieux problème et une préoccupation majeure en raison des effets néfastes qu'elle provoque dans le monde entier. Ce travail est une étude comparative de deux travaux de recherches de Meghnous et *al.* (2019) et Kassa-Laouar et *al.* (2020), dont l'objectif est de sélectionner une microflore endophytique isolées à partir des racines d'*Hedysarum pallidum* Desf poussant sur des sols antimoniaux. Ainsi évaluer le niveau de stress oxydatif par l'étude de l'impact de l'antimoine (Sb) sur la croissance bactérienne et fongique. De plus la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), Malondialdéhyde (MDA) et les variations des activités de la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) liées à l'effet de ce métal. Les résultats indiquent que la production des antioxydants par les deux endophytes est un signe de leur résistance à la toxicité de l'antimoine, de sorte que *Serratia marcescens* toléré jusqu'à 450 mM de Sb et *Aspergillus tubingensis* 500 Mm de Sb. Ainsi, la mesure des biomolécules produites par les deux souches exposées à une contrainte métallique a mis en évidence leur degré de résistance et /ou tolérance au métal impliqué et donc son utilisation éventuelle dans la bioremédiation des sols contaminés par l'antimoine.

Mots clés : la réponse antioxydante, antimoine, *Aspergillus tubingensis*, *Serratia marcescens*, Biorémédiation.

Abstract

The release of inorganic antimony into the soil has become a serious problem and a major concern due to the harmful effects that causes worldwide. This work is a comparative study of two research works by Meghnous et al. (2019) and Kassa-Laouar et al. (2020), whose objective was to select endophytic microflora isolated from the roots of *Hedysarum pallidum* Desf growing on antimony soils. Thus, evaluate the level of oxidative stress by studying the impact of antimony (Sb) on bacterial and fungal growth. In addition to the production of hydrogen peroxide (H₂O₂), Malondialdehyde (MDA) and variations in catalase activity (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, are related to the effect of this metal. Such results indicate that the production of antioxidants by both endophytes is a sign of their resistance to antimony toxicity, so that *Serratia marcescens* tolerated up to 450 mM and *Aspergillus tubingensis* 500 mM Sb. Thus, the measurement of the bimolecular produced by the two strains exposed to a metallic stress demonstrated their degree of resistance and /or tolerance to the metal involved and therefore its possible use in the bioremediation of soils contaminated by antimony.

Key words: antioxidant response, antimony, *Aspergillus tubingensis*, *Serratia marcescens*, Bioremediation.

ملخص

أصبح إطلاق الإثمد الغير عضوي في التربة مشكلة خطيرة ومصدر قلق كبير بسبب الآثار الضارة التي يسببها في جميع أنحاء العالم. هذا العمل عبارة عن دراسة مقارنة لعمليتين بحثيتين قام بهما Meghnous et al. (2019) و Kassa-Laouar et al. (2020) ، والذي كان الهدف منه هو اختيار ميكروبات داخلية معزولة من جذور *Hedysarum pallidum* Desf وهي نبتة تنمو في التربة الملوثة بالإثمد. وبالتالي تقييم مستوى الإجهاد التأكسدي من خلال دراسة تأثير الإثمد (Sb) على نمو السلالات البكتيرية والفطرية ، بالإضافة إلى إنتاج بيروكسيد الهيدروجيني (H_2O_2) ، مالونديالديهيد (MDA) والتغير في نشاط الكاتالاز (CAT) و ديسموتاز الفائق (SOD) له علاقة بتأثير هذا المعدن. يعد إنتاج مضادات الأكسدة من قبل اثنين من الخلايا الميكروبية الداخلية علامة على مقاومتها لسمية الإثمد ، بحيث تتحمل *Serratia marcescens* ما يصل إلى 450 milli molaire و *Aspergillus tubingensis* 500 milli molaire من Sb وبالتالي ، فإن قياس الجزيئات الحيوية التي تنتجها السلالتان المعرضتان سيظهر الإجهاد المعدني درجة مقاومته للمعدن المعني وبالتالي استخدام كلتا السلالتين محتمل في المعالجة الحيوية للتربة الملوثة بالإثمد.

الكلمات المفتاحية: الاستجابة المضادة للأكسدة ، الإثمد ، *Aspergillus tubingensis* ، *Serratia marcescens* ، المعالجة الحيوية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Titre

**Etude comparative de la réponse antioxydante d'*Aspergillus tubingensis*
et *Serratia marcescens* au stress oxydatif généré par l'antimoine**

Résumé

La libération d'antimoine inorganique dans le sol est devenue un sérieux problème et une préoccupation majeure en raison des effets néfastes qu'elle provoque dans le monde entier. Ce travail est une étude comparative de deux travaux de recherches de Meghnous et *al.* (2019) et Kassa-Laouar et *al.* (2020), dont l'objectif est de sélectionner une microflore endophytique isolées à partir des racines d'*Hedysarum pallidum* Desf poussant sur des sols antimoniaux. Ainsi évaluer le niveau de stress oxydatif par l'étude de l'impact de l'antimoine (Sb) sur la croissance bactérienne et fongique. De plus la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), Malondialdéhyde (MDA) et les variations des activités de la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) liées à l'effet de ce métal. Les résultats indiquent que la production des antioxydants par les deux endophytes est un signe de leur résistance à la toxicité de l'antimoine, de sorte que *Serratia marcescens* toléré jusqu'à 450 mM de Sb et *Aspergillus tubingensis* 500 Mm de Sb. Ainsi, la mesure des biomolécules produites par les deux souches exposées à une contrainte métallique a mis en évidence leur degré de résistance et /ou tolérance au métal impliqué et donc son utilisation éventuelle dans la bioremédiation des sols contaminés par l'antimoine.

Mots clés : la réponse antioxydante, antimoine, *Aspergillus tubingensis*, *Serratia marcescens*, Biorémédiation.

Membre du jury :

Président du jury : BOULAHROUF Khaled (MCB-UFM Constantine).
Rapporteur : MEGHNOUS Ouissem (MAB-UFM Constantine).
Examinatrice : KASSA-LAOUR Mounia (MCB-UFM Constantine).

Présentée par :
BOUKARBOUA Roumeïssa
MISSI Belkis Aya Ellah
TOUBANE Meriem El Batoul

Année universitaire : 2020-2021

